Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

EINE METHODE ZUR BESTIMMUNG VON ADRIAMYCIN UND SEINEN METABOLITEN IN PLASMA, LEUKOZYTEN UND GEWEBEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerhard Ehninger
aus Simmozheim

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523712_0042

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

EINE METHODE ZUR BESTIMMUNG VON ADRIAMYCIN UND SEINEN METABOLITEN IN PLASMA, LEUKOZYTEN UND GEWEBEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Gerhard Ehninger
aus Simmozheim

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. H.-E. Hoffmeister
1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Wilms
(Professor Dr. H. D. Waller)
2. Berichterstatter: Professor Dr. K. F. Sewing

Meinen Eltern gewidmet

Abkürzungen:

Adm	Adriamycin
Adm-ol	Adriamycinol
Adm-on	Adriamycinon
E	Extinktion
Exc	Excitation
Em	Emission
FE	Fluoreszenzeinheiten
G	Gewebe
Ga	Galle
n. Stl.	nach der Startlinie
P	Plasma
PM	Photomultiplier
U	Urin

Anmerkung: Verhältnisangaben beziehen sich auf die Anteile im Gesamtvolumen z. B.
1n HCL/H_2O/CH_3OH(5:20:225, v:v:v)
bedeutet: Das Gesamtvolumen von 250 ml setzt sich aus 5 ml 1n HCL + 20 ml H_2O + 225 ml CH_3OH zusammen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
1. Herkunft und Struktur	1
2. Wirkungsmechanismus	4
3. Klinische Bedeutung	5
4. Unerwünschte Wirkungen	7
5. Ziel der Untersuchung	8
6. Bekannte Bestimmungsmethoden	9
B. Methodik und Material	14
1. Extraktion	14
1.1. Löslichkeit	14
1.2. Extraktionsmittel	14
1.3. pH-Wert	14
2. Chromatographie	15
2.1. Dünnschichtchromatographie	15
2.1.1. Materialien	15
2.1.2. Methoden	15
2.1.2.1. Zeit	15
2.1.2.2. Auftrag	15
2.1.2.3. Fließmittel	15
2.1.2.4. Extraktion aus der Platte	16
2.2. Säulenchromatographie	16
3. Spektrographie	16
3.1. Absorptionsspektrometrie	16
3.2. Fluoreszenzspektrometrie	16
4. Lösungen mit Adm, Adm-ol, Adm-on	17
5. Extraktion von Adm, Adm-ol und Adm-on	17
5.1. Extraktion aus Plasma	17
5.2. Extraktion aus Leukozyten	18
5.3. Extraktion aus Gewebe	19
6. Klinische Anwendung	19
6.1. Spiegel in Plasma und Leukozyten	19
6.2. Konzentration im Gewebe	19
7. Saure Hydrolyse	20
C. Ergebnisse	21
1. Extraktion	21
1.1. Löslichkeit	21
1.2. Extraktionsmittel	22

Seite

1.3. pH-Wert 22
2. Chromatographie 23
2.1. Dünnschichtchromatographie 23
2.1.1. Fließmittel 23
2.1.2. Extraktion bei pH 2 und pH 8,8 23
2.1.3. Extraktion bei pH 8,8 23
2.2. Säulenchromatographie 25
3. Spektrographie 27
3.1. Absorptionsspektrographie 27
3.2. Fluoreszenzspektrometrie 30
3.3. Eichkurven 36
4. Vergleich verschiedener Methoden 40
4.1. Variation des Extraktionsverfahrens 40
4.2. Extraktionsgrad für Adm, Adm-ol, Adm-on 45
4.2.1. Für Adm 45
4.2.2. für Adm-ol 45
4.2.3. für Adm-on 46
4.3. Vergleich der Spektren 46
5. Klinische Anwendung 51
5.1. Spiegelverlauf in Plasma u. Leukozyten 51
5.2. Metabolismus bei Inkubation m. Vollblut 51
5.3. Organkonzentrationen 51
5.4. Haltbarkeit 54
6. Saure Hydrolyse 54
D. Diskussion 55
1. Extraktion 55
2. Chromatographie 56
3. Spektrographie und Linearität 57
4. Wahl des Extraktionsverfahrens, Nachweisgrenzen, Spezifität, Reproduzierbarkeit 58
5. Klinische Anwendung 61
6. Saure Hydrolyse 63
E. Zusammenfassung 64
F. Literaturverzeichnis 65

A. Einleitung

1. Herkunft und Struktur

Adriamycin ist ein aerobes Stoffwechselprodukt von Streptomyces peucetius var. caesius, das 1967 von Arcamone et al. (2) isoliert wurde. Die Struktur und die Konfiguration wurden mit chemischen und spektroskopischen Methoden aufgeklärt (3, 4). Es besteht aus einem Anthracyclinringsystem und einem Aminozucker (Abb. 1). Von Daunomycin, das zuvor ebenfalls aus Kolonien von Streptomyces peucetius isoliert wurde, unterscheidet es sich nur durch eine Hydroxylierung an der Seitenkette. Adm kann deshalb auch aus Daunomycin durch eine Hydroxylierung halbsynthetisch hergestellt werden (1). Durch eine milde saure Hydrolyse wird Adm in Adm-on (Abb. 2) und einen Aminozucker gespalten (3). Im Metabolismus entsteht Adm-on aus Adm durch eine reduzierende Glykosidabspaltung (6). Ein weiterer Metabolit ist Adm-ol (Abb. 3), das durch eine Reduktion an der Carbonyl-Seitenkette entsteht (8).

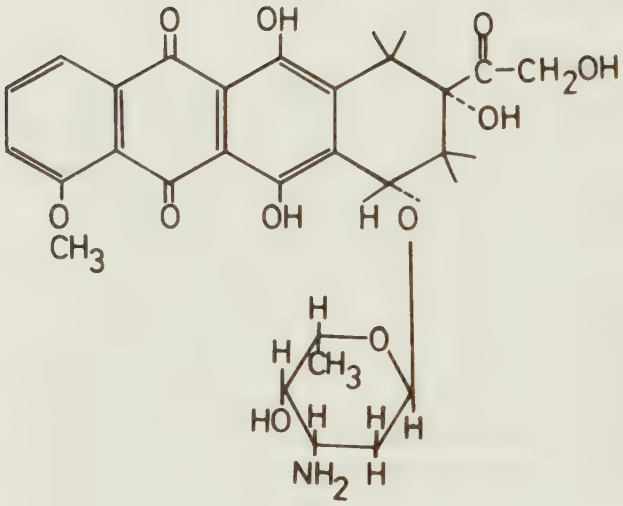


Abb. 1: Adriamycin

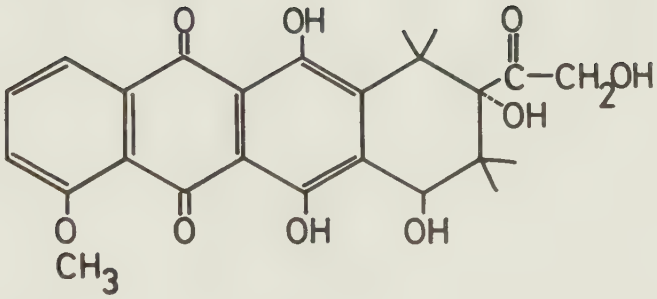


Abb. 2: Adriamycinon

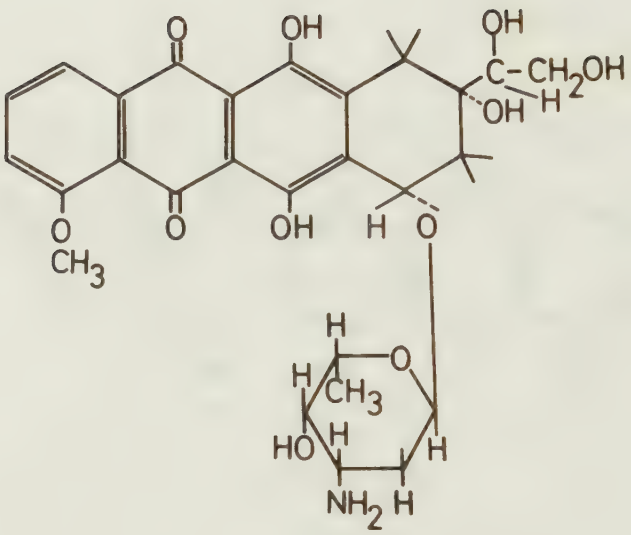


Abb. 3: Adriamycinol

2. Wirkungsmechanismus

Adm bindet sich spezifisch an die DNA durch Intercalation zwischen zwei benachbarte Basenpaare der Doppelhelix (26, 52). Dadurch entsteht eine stereochemische Veränderung, die die Enzyme der DNA-Replikation und -Transkription hemmt (25). Diesen Ergebnissen aus zellfreien Systemen entsprechen Daten aus in-vivo-Versuchen und Zellkulturen, wo der Einbau von Vorstufen in die DNA und RNA, eine verminderte Mitoserate und das Auftreten von Chromosomenaberrationen beobachtet wurden (34, 41, 46, 48).

3. Klinische Bedeutung

Das Spektrum der Antitumorwirkung ist im Vergleich zu anderen Zytostatika sehr weit (Tab. 1). Bei neun Tumorkategorien ist die Wirksamkeit nachgewiesen. Darunter befinden sich solide Tumoren, die bisher gegen eine Chemotherapie als unempfindlich galten. Dies gilt besonders für das Weichteil- und Knochensarkom. Bei sieben weiteren Kategorien ist es wirksam, eine abschließende Beurteilung ist aber noch nicht möglich. Bei drei weiteren ist Adm nicht wirksam, für fünf weitere gibt es keine hinreichende Daten (19).

Tab. 1: Antitumorspektrum von Adriamycin nach Carter (19)

Festgestellte Aktivität
Mammacarcinom
Weichteil- und Knochensarkom
Blasen-Adenocarcinom
kleinzelliges Bronchuscarcinom
Hodencarcinom
Schilddrüsencarcinom
Pädiatrische solide Tumoren
Maligne Lymphome
Akute Leukämien
Ohne Aktivität
Dickdarm-Adenocarcinom
Malignes Melanom
Nieren-Carcinom

Fortsetzung Tab. 1

Mögliche Aktivität

Magencarcinom
Ovarcarcinom
Prostatacarcinom
Cervix-Plattenepithelcarcinom
Plattenepithelcarcinom (Kopf und Hals)
Hepatom
Multiples Myelom

nicht hinreichende Daten

Pankreas-Adenocarcinom
Ösophagus-Plattenepithelcarcinom
Endometrium-Adenocarcinom
Hirntumoren
Chronische Leukämien

Beim Mamma-Adenocarcinom berichten Salmon und Jones (39) über eine Ansprechrate von 84 % mit einer Kombination von Adm und Cyclophosphamid.

Für die Weichteil-Sarkome entwickelten Gottlieb et al. eine Kombination aus Adm, Vincristin, Cyclophosphamid und DIC, auf die 55 % ansprachen (28). Bei der Monotherapie des Blasen-Carcinoms fand sich ein Ansprechen auf Adm bei 35 % (19).

Das Schilddrüsencarcinom spricht in 30 % an, auch hier wird dabei nicht in weitere histologische Unterformen differenziert.

Aktivitäten von Adm bei pädiatrischen soliden Tumoren wurden beim Wilms Tumor (68 %), Neuroblastomen (33 %), Osteosarkomen (55 %), Ewing Sarkom (55 %) und Rhabdomyosarkom (41 %) beobachtet (19, 43, 45, 49).
41 % der Hodgkin-Lymphome und 35 % der Non-Hodgkin-Lymphome sprechen auf eine Behandlung mit Adriamycin an (17).
Bei akuten Leukosen im Erwachsenenalter werden Kombinationen mit Adm zur Induktionsbehandlung (Mc Credie, 33) verwendet.

4. Unerwünschte Wirkungen

Durch die unspezifische Zytotoxizität von Adm unterliegen vor allem rasch proliferierende Gewebe des Organismus wie das hämatopoetische Zellsystem, das Schleimhautepithel des Magen-Darm-Kanals (Stomatitis, Übelkeit, Erbrechen) und die Zellen der Haarfollikel (Alopezie) einer besonderen Schädigung (19, 51). Die wichtigsten Therapiekomplikationen sind durch die ausgeprägte Myelotoxizität bedingt (in 60-80 %). Am frühesten kann die Leukopenie beobachtet werden. Eine Zellzahl von 2 000 Z/mm^3 sollte nicht unterschritten werden. Bei der Schädigung der anderen Systeme treten Anämien und Thrombozytopenien auf. Während einer Behandlung mit Adm kann eine kardiotoxische Nebenwirkung mit EKG-Veränderungen oder eine Kardiomyopathie auftreten. (21, 35, 37, 51). Die Häufigkeit nimmt durch eine Begrenzung der Gesamtdosis auf 550 mg/m^2 ab. Die Toxizität von Adm ist bei Patienten mit hepatischen Vorerkrankungen noch erhöht (15, 16).

5. Ziel der Untersuchung

Die hohe Toxizität von Adm und die Gefahr der Kumulation bei hepatischen Vorerkrankungen besonders bei Cholestase erfordern eine routinemäßige Kontrolle des Plasma- und des Leukozytenspiegels bei den Patienten mit einer Adm-Therapie. Bei der weiteren Auswertung dieser pharmakokinetischen Daten können vielleicht die Dosierungsrichtlinien verbessert werden:

1. Anpassung der Dosierung an die individuelle Pharmakokinetik.
2. Ein therapeutischer Wirkspiegel kann festgelegt werden.
3. Eine Kumulation kann bereits vor den Nebenwirkungen erkannt und diese durch das Absetzen verhindert werden.
4. Wenn eine Korrelation von bestimmten Plasma- und Leukozytenspiegeln zu einem Ansprechen der Therapie besteht, wird eine "in-vivo-Testung" möglich.

Hier sollen einige chemische und physikalische Eigenschaften von Adm, Adm-ol und Adm-on untersucht werden, und daraus eine einfache, spezifische und empfindliche Bestimmungsmethode entwickelt werden.

6. Bekannte Bestimmungsmethoden

Es wurden einige auf verschiedenen Prinzipien beruhende Verfahren beschrieben:

1. Bioassay (30)
   Kolonien von B. subtilis werden durch Adriamycin, aber auch durch seine Metaboliten und andere Substanzen gehemmt. Diese Methode ist störanfällig, unspezifisch und unempfindlich.
2. H^3-markiertes Adriamycin (24, 30, 42)
   Da Tritium mit Wasser ausgetauscht wird und die Gesamtradioaktivität ohne Trennung der Metabolite gemessen wird, ist die Methode ungenau und unspezifisch. Sie eignet sich auch nur im Tierversuch und sollte nicht wie bei Di Fronzo et al. (24) am Menschen angewendet werden.
3. Radioimmunoassay (10, 32, 47)
   Die Anwendbarkeit ist begrenzt, da Kreuzreaktionen der Antikörper mit einigen Metaboliten von Adriamycin bestehen, andere jedoch nicht erfaßt werden (10). Für Urin ist die Hochdruckchromatographie als Trennungsmethode möglich (32).
4. Fluorometrie (Tab. 2)
   Hierbei wird die Fluoreszenz des Anthracyclinringsystems ausgenützt.
   Einige Verfahren messen nur die Gesamtfluoreszenz (Tab. 2 A). Andere führen nach der Extraktion eine saure Hydrolyse durch und messen die Aglycone (Tab. 2 B). Dadurch kann Adriamycion nicht erfaßt werden, es entstehen aber auch Artefakte (siehe Ergebnisteil). Methoden ohne Hydrolyse aber mit Trennung der Metaboliten finden sich in Tab. 2 C.

Autor	Anwendungs-bereich	Extraktion
A Gesamtfluoreszenz		
Bachur (8) Prinzip wie Bachur (9) und Benjamin (13)	P	75% CH_3CH_2OH-o,45 n HCl
Arena (5) Prinzip wie Pasqualino (36) für Daunomycin Grundlage: Kohns Technik für Tetra- cycline (31)	G, Ga	nach Homogenisierung: 1. Trichloressigsäure mit 0,004 m K_2PO_4 2. Na-Acetat mit 0,06 m $Pb(NH_3)_2$ 3. 0,32 m KJO_3 4. Essigsäure, 0,3 m Na-Barbital, 0,1 m $CaCl_2$
Schwartz (40)	G	1. $AgNO_3$ 2. Iso-amyl-Alkohol
B mit Hydrolyse		
Chan und Harris (20)	P,G,Ga	1. konz. HCl/CH_3CH_2OH/H_2O (0,15:2:2) 2. Hydrolyse des Überstandes (100°C) 3. Extraktion mit Benzol für Adm-on: 1. Methanol 2. Benzol
Benjamin (13,16)	P	Adm und Metabolite: 75% Äthanol-0,45n HCl Metabolite: 1. 75% Äthanol-0,45 n HCl 2. Hydrolyse des Überstandes (100°C) 3. Extraktion mit Äthylacetat
	U	Adm und Metabolite: 1. Sättigung mit NaCl 2. Extraktion mit n-Butanol (pH 4,5) Metabolite wie oben

Tab. 2 Bekannte Bestimmungsmethoden

Trennung	Meßbedingungen Ecx/Em (nm)
DC-Glasfiber:	474/556
$CHCl_3$:CH_3OH:CH_3COOH 100:2,0:2,5	
DC-Kieselgel H:	470/585
$CHCl_3$:CH_3OH:CH_3COOH 100:2,0:2,5	
$CHCl_3$:CH_3OH:CH_3COOH:H_2O 80:20:14:6	470/585

Autor	Anwendungs-bereich	Extraktion
C mit Trennung ohne vorherige Hydrolyse		
Bullock (18)	G	Chloroform
Rosso (38)	P,U	n-Butanol
Creasey (23)	P,U	1-Butanol
Takanashi (44)	U	Adsorption an polymeres Polystyren
Watson (50)	P	Chloroform:Isopropanol 1:1
Benjamin	P,U	Chloroform:Isopropanol 1:1
Bachur (8) Prinzip von Cradock (22)	G,P,U,Ga	Chloroform:Methanol 2:1 (für G,P)
Asbell (6)	G	

Tab. 2 Bekannte Bestimmungsmethoden

Trennung	Meßbedingungen Exc/Em (nm)
DC-Kieselgel: $CHCl_3$:CH_3CH_2OH:CH_3COOH:H_2O 119:4:5:12	nur Angabe von Spektren
DC-Kieselgel H: 1. $CHCl_3$:CH_3OH:CH_3COOH 80:20:4 2. Butanol:CH_3COOH:H_2O 4:1:5	
DC-Kieselgel: $CHCl_3$:CH_3OH:CH_3COOH 80:20:4	mit Scanner 485/570
DC-Kieselgel: 1. $CHCl_3$:CH_3OH:CH_3COOH 100:2:5 2. $CHCl_3$:CH_3OH:CH_3COOH:H_2O 80:20:14:6 für die Isolation der Metaboliten zuvor Kieselgelsäulenchromatographie	470/570
DC-Kieselgel: 1. $CHCl_3$:CH_3OH:CH_3COOH 93:5:2 2. $CHCl_3$:CH_3OH:CH_3COOH 76:20:4	mit Scanner 475/580
DC : keine weiteren Angaben	
DC-Kieselgel: 1. Diäthyläther 2. $CHCl_3$:CH_3OH:CH_3COOH:H_2O 80:20:14:6 3. $CHCl_3$:CH_3OH:CH_3COOH 100:2:5	
DC-Kieselgel G oder H: $CHCl_3$:CH_3CH_2OH:CH_3COOH:H_2O 79:4:5:12	490/520-620

B. Methodik und Material

Adriamycin, Adriamycinol und Adriamycinon wurden als Referenzsubstanzen von Farmitalia, Mailand, zur Verfügung gestellt. Für die klinische Anwendung wurde Adriblastin ^{R} (Deutsche Montedison, Freiburg) verwendet. Alle Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p.a.

1. Extraktion

1.1. Löslichkeit

Einige Kristalle von Adm, Adm-ol oder Adm-on werden in Chloroform, Methanol, Methanol/Acetatpuffer 0,2 m (9 : 1, v : v) bzw. Wasser gegeben. Gut löslich bedeutet, es läßt sich eine stark rote Färbung erreichen, bei schlechter Löslichkeit nimmt das Lösungsmittel eine schwach rötliche Färbung an.

1.2. Extraktionsmittel

Zu 1 ml Tris-Puffer pH 8,6 wird 1 ml Gemisch aus Wasser und Methanol in verschiedenen Mischungsverhältnissen, 10^{-5} g Adm, bzw. 10^{-5} g Adm-ol, bzw. 2 x 10^{-6} g Adm-on und 2 ml Chloroform zugefügt. Die Mischung wird 5 Min. in einem Polyäthylen-Zählfläschchen Zinser 714/1B geschüttelt. Nachdem sich beide Phasen getrennt haben, wird die untere Phase (Chloroformphase) bei Exc 475/ Em 550 nm fluorometrisch gemessen.

1.3. pH-Wert

Zu 2 ml Tris-Puffer (pH7,2-9) wird 10^{-5} g Adm bzw. 10^{-5} g Adm-ol bzw. 2 x 10^{-6} g Adm-on zugefügt und mit 2 ml Chloroform/Methanol (9 : 1, v : v) auf einem Schüttler extrahiert. Die untere Phase wird fluorometrisch (siehe 1.2.) gemessen.

2. Chromatographie

2.1. Dünnschichtchromatographie

2.1.1. Materialien

Verwendet werden Riedel-de Häen DC-Karten SI Nr. 37361 und Merck DC Fertigplatten Kieselgel 60 Nr. 5721. In einem Glasgefäß von Desaga, Heidelberg, wird bei Zimmertemperatur senkrecht aufsteigend entwickelt. Die Innenfläche wird mit Chromatographie-Papier Whatman DE 81 ausgelegt, um in gesättigter Atmosphäre zu arbeiten. Es werden jeweils 250 ml Fließmittel eingefüllt.

2.1.2. Methoden

2.1.2.1. Zeit

Bei der zweistufigen Chromatographie wird nach 5 und 40 Min, bei der vierstufigen nach 5, 7.5, 10 und 40 Min. die Platte aus dem Gefäß genommen und mit einem Föhn getrocknet. Bei der zweidimensionalen Chromatographie wird die Platte nach 40 Min. getrocknet und senkrecht zur vorherigen Richtung entwickelt.

2.1.2.2. Auftrag

Der eingedampfte Extrakt aus 1 ml Plasma, bzw. gezählter Menge Leukozyten, bzw. 1 g Gewebe nach unten angegebenen Methoden wird mit 0,100 ml und 2 x 0,050 ml Chloroform aus dem PPN-Röhrchen, 14 ml / 17,0 / 100 mm / Greiner, in je 30 sec mit einem Heidolph-Whirlmix gelöst. Die 0,100 ml Portion wird auf eine 2,5 cm lange, die 0,050 ml Portionen zusammen auf eine 1,5 cm lange Startlinie aufgetragen.

2.1.2.3. Fließmittel

Als Fließmittel werden zwei Lösungen verwendet. Die erste besteht aus $CHCl_3$ / CH_3OH / H_2O (150 : 60 : 10, v : v : v), die zweite aus CH_2Cl_2 / CH_3OH (4 : 1, v : v).

2.1.2.4. Extraktion aus der Platte

Nach der Entwicklung wird die Lage von Adm, Adm-ol und Adm-on unter einem UV-Licht 254 nm mit einem Bleistift markiert und mit einer Schere aus der Alufolie ausgeschnitten. Von den Streifen werden in einem Polyäthylen-Zählfläschen Zinsser 714 / 1 B Adm und Adm-ol mit 2 ml aus 1 n HCl / H_2O / CH_3OH (5 : 20 : 225, v : v : v) und Adm-on mit 2 ml aus $CHCl_3$ / CH_3OH (2 : 1, v : v) extrahiert. Die Fläschen werden mit einem Deckel verschlossen und über Nacht horizontal im Kühlschrank gelagert. Dann wird die Flüssigkeit in ein PPN-Röhrchen 14 ml (17,0 / 100 mm), Greiner, geschüttet. Nach 2 h ist das störende Kieselgel sedimentiert und der Überstand kann bei Exc 475 nm / Em 550 nm gemessen werden.

2.2. Säulenchromatographie

Die Säule Pharmacia K 15 300 x 15 mm wird mit Sephadex G - 10 oder Kieselgel 100 - 200 µ (Serva 27171) gefüllt. Adm und Adm-ol (je 0,1 mg) werden in 4 ml Eluens aufgetragen. Eluiert wird mit Methanol / Acetatpuffer 0,2 m (pH 4,6) (4 : 1, v : v) bei einer Fließgeschwindigkeit von 10 Tropfen pro Minute. Das Eluat wird mit einem LKB Ultrovac-Fraktionssammler in verschiedenen Fraktionsvolumina aufgefangen und die Fluoreszenz bei Exc 475 nm/ Em 550 nm gemessen.

3. Spektrographie

3.1. Absorptionsspektrometrie

Die Messungen werden mit einem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II in einer OS 10 mm Küvette durchgeführt.

3.2. Fluoreszenzspektrometrie

Es wird ein Aminco-Bowman Spektralfluorometer mit Ratio-Einheit verwendet. In einer 1 ml Quarzküvette wird bei verschiedenen Spaltweiten und Photomultiplierеinstellungen (PM) gemessen. Die Spektren werden mit einem Houston-Instrument Omnigraphic 2 000 aufgenommen. Die Excitations-

spektren werden bei Em 550 nm, die Emissionsspektren bei einer Exc 475 nm aufgenommen. Mit dem Fluoreszenzblock wird bei der Exc 475 / Em 550 nm, Spaltbreite Einlaß 1 mm, Auslaß 1 mm und PM 0,5 auf 80 FE geeicht.

4. Lösungen mit Adm, Adm-ol, Adm-on

Adm, Adm-ol werden im Vakuum mit Kieselgel getrocknet, auf einer Feinanalysenwaage in ein PPN-Röhrchen (s.o.) eingewogen und mit einem bestimmten Volumen Methanol / 1 n HCl / H_2O (225 : 20 : 5, v : v : v) aufgelöst. Ebenso wird mit Adm-on verfahren. Da aber Adm-on in Chloroform nicht vollständig löslich ist, werden die ungelösten Kristalle mit einer Stock-Zentrifuge bei 1 700 g abzentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und der unlösliche Anteil erneut getrocknet und anschließend gewogen. Im Überstand befand sich die Differenz zur ersten Einwaage. Von den Adm-, Adm-ol-, Adm-onlösungen werden nun Verdünnungsreihen hergestellt und die Eichkurven erstellt. Zur Bestimmung des Extraktionsgrades muß auch eine wäßrige Lösung von Adm-on vorhanden sein. Eine bestimmte, in Chloroform gelöste Menge von Adm-on wird im Glaskolben mit einem Heidolph-Rotationsverdampfer in dünner Schicht eingedampft. Dann wird es mit 3 x 2 ml Methanol / Acetatpuffer 0,2 m (pH 4,6) (9 : 1, v : v) aufgelöst und mit Wasser auf das gewünschte Volumen aufgefüllt.

5. Extraktion von Adm, Adm-ol und Adm-on

5.1. Extraktion aus Plasma

Einzelne Bedingungen werden variiert, doch es ergibt sich immer folgender Ablauf:

Schritt 1 :

1 ml Plasma wird mit 0,20 ml 1 n HCl auf einen pH von ungefähr 2 eingestellt und mit 20 ml Chloroform in einem Glasgefäß mit Schliffstopfen horizontal 15 Min. geschüttelt. Die Phasen werden in einer Hettich-

Zentrifuge Silenta III bei 170 g getrennt. Mit einer Braun-Einmalspritze 5 ml mit Einmalkanüle Nr. 1 wird die Eiweißschicht durchstochen und die Chloroform-Phase abgesaugt, in einem Glaskolben mit einem Heidolph-Rotationsverdampfer bei 30° C Wassertemperatur auf etwa 1 ml konzentriert und in ein PPN-Röhrchen (s.o.) überführt. Der Glaskolben wird mit 1 ml und dann mit 0,5 ml Chloroform nachgewaschen und das gesamte Extrakt in einem Exsikkator bei 20° C eingedampft.

Schritt 2 :
Die wäßrige Phase aus Schritt 1 wird mit 0,2 ml 1 n NaOH und 2 ml Tris-Puffer (pH 8,8) auf pH 8,8 eingestellt. Man pipettiert 5 ml Methanol und 20 ml Chloroform hinzu und verfährt nochmals wie unter Schritt 1 beschrieben.

Schritt 3 :
Die Rückstände aus Schritt 1 und 2 werden mit Chloroform aufgelöst, auf die DC-Alufolie aufgetragen (genaueres siehe 2.1.2.2. Auftrag) und mit Dichlormethan / Methanol (4 : 1, v : v) vierstufig entwickelt (siehe auch 2.1.2.1. und 2.1.2.3.).

Schritt 4 :
Adm, Adm-ol, Adm-on bzw. die entsprechenden Stellen des Leerwertes werden unter dem UV-Licht mit einem Bleistift markiert, ausgeschnitten und in einem Fläschchen extrahiert (siehe 2.1.2.4. Extraktion aus der Platte).

Schritt 5 :
Die Fluoreszenz der Extraktionsflüssigkeit wird bei Exc 475 / Em 550 nm (2.1.2.4.) gemessen. Die Konzentration wird aus der Eichkurve abgelesen und unter Berücksichtigung des Extraktionsgrades auf 1 ml Plasma umgerechnet.

5.2 Extraktion aus Leukozyten
5 ml heparinisiertes Vollblut wird auf Isopaque-Dextran 0,5 h separiert. Plasmen und Leukozyten werden abge-

hoben und 5 Min. bei 300 g zentrifugiert. Die Leukozyten werden mit 1 ml 0,1 m Magnesium-Titriplex (um eine Verklumpung zu verhindern) und 1 ml NH_4Cl (zur Hämolyse nicht separierter Erythrozyten) aufgeschüttelt und erneut zentrifugiert (wie oben). Der Überstand wird abgeschüttet. Die Leukozyten werden nun in 1 ml Medium RPMI - 1640 (Microbiological Associates, Bethesda, Maryland) aufgeschüttelt, gezählt und dann mit einem Branson Sonic Power Sonifier^R B-12 beschallt (Stufe 1-2 für 1 Min. mit Kühlung). Adm, Adm-ol und Adm-on werden nun wie in 5.1 extrahiert.

5.3. Extraktion aus Gewebe
Abweichungen von der Methode in 5.1 ergeben sich nur bei Schritt 1 und 2. Zu 1 g Gewebe werden die dort angegebenen Flüssigkeiten zugefügt und mit einem Ultraturrax mit 100 V für 5 Min. homogenisiert. Zwischendurch muß gekühlt werden. Sonst wird wie in 5.1 verfahren.

6. Klinische Anwendung

6.1. Spiegel in Plasma und Leukozyten
Patient F.A. (metastasierendes Osteosarkom, keine Leberfunktionsstörungen) erhält 50 mg Adriblastin (Leukopenie von 3200 Leukozyten/u). 5, 10, 30 Min. und 2, 23, 48 h nach der Injektion werden am kontralateralen Arm je 5 ml heparinisiertes Blut abgenommen und wie in 5.1 und 5.2 spätestens nach 2 Tagen bearbeitet.

6.2. Konzentration in Gewebe
Leber-, Pankreas-, Nieren- und Herzgewebe werden einer 6 Tage nach Adriblastinbehandlung verstorbenen Patientin (40 mg/m^2 $\hat{=}$ 56 mg) entnommen. Die Patientin litt an einem metastasierenden Mamma-Carcinom, keine Leberfunktionsstörung.

7. Saure Hydrolyse

Adriamycin wird bei 100° C in 0,1 n HCl in 20 Min. zu Adriamycinon hydrolysiert. Diese wasserunlösliche Substanz wird nun durch verschiedene Verfahren isoliert.

A) Adm-on wird mit einer Stock-Zentrifuge bei 1 700 g im PPN-Röhrchen abzentrifugiert und zweimal mit Wasser gewaschen.

B) Hydrolyse-Flüssigkeit wird durch Schleicher-Schüll Selecta Falten-Filter ∅ 9 cm gefiltert und mit Wasser nachgewaschen.

C) Filtrat aus B bleibt 24 h stehen und wird dann nach A behandelt.

Mit Verfahren A-C gewonnene Substanzen werden bei 80° C getrocknet und auf Riedel-de Häen Folien aufgetragen und mit Chloroform / Methanol / Wasser (150 : 60 : 10, v : v : v) entwickelt.

C. Ergebnisse

1. Extraktion

1.1. Löslichkeit

Adm und Adm-ol sind in Wasser und Methanol gut, in Chloroform schlecht löslich. Das apolare Adm-on verhält sich umgekehrt, in Wasser unlöslich, in Methanol schlecht löslich. Besser löst sich Adm-on in Methanol / Acetatpuffer 0,2 m (9 : 1, v : v) und in Chloroform. Jedoch werden größere Adm-on-Kristalle nicht vollständig aufgelöst. In Chloroform gelöstes, anschließend eingedampftes Adm-on kann nur dann wieder vollständig gelöst werden, wenn es im Rotationsverdampfer in sehr dünner Schicht aufgedampft wurde (siehe Seite 17). Es bildet sonst größere Kristalle.

1.2. Extraktionsmittel

Adm-on, mit Methanol / Acetatpuffer in Wasser gelöst, läßt sich mit Chloroform wieder gut extrahieren. Adriamycin und Adriamycinol lassen sich mit Chloroform gering aus der wässrigen Phase extrahieren. Fügt man jedoch Methanol hinzu, das sich in Chloroform und Wasserphase verteilt, so nimmt die Löslichkeit von Adriamycin und Adriamycinol in der Wasserphase ab und in der Chloroformphase zu. Mit zunehmendem Methanol / Wasser-Quotienten steigt der Extraktionsgrad an (siehe Tab. 3).

CH_3OH/H_2O (v : v)	Adriamycin (FE)	Adriamycinol (FE)
0 : 4	22,9	10
1 : 7	23,3	15,5
1 : 3	26,8	15,5
3 : 5	27,6	19,4
1 : 1	27,8	20,8

Tab. 3 Abhängigkeit der Extraktion von Adm und Adm-ol durch Chloroform vom CH_3OH / H_2O-Quotienten.

1.3 pH-Wert

Die Extraktion von Adm-on ist vom pH-Wert unabhängig. Adm und Adm-ol werden bei pH 8,8 am besten extrahiert (siehe Tab. 4).

pH	Adm	Adm-ol (FE)
7,6	34,5	13,9
8,0	35,9	18,7
8,2	38,5	25,8
8,4	36,0	25,9
8,6	37,0	26,6
8,8	47,5	32,5
9,0	35,0	27,2

Tab. 4 Abhängigkeit der Adm und Adm-ol-Extraktion vom pH-Wert

2. Chromatographie

2.1. Dünnschichtchromatographie

2.1.1. Fließmittel

Die Rf-Werte von Adm, Adm-ol und Adm-on auf Kieselgelplatten der Firmen Merck und Riedel-de Häen mit Chloroform/Methanol/H_2O (150 : 60 : 10, v : v : v) als Fließmittel bei 1-stufiger Entwicklung sind in Tab. 5 zusammengestellt.

	Adm	Adm-ol	Adm-on
Riedel-de Häen	0,17	0,10	0,77
Merck	0,14	0,08	0,67

Tab. 5 Rf-Werte

Tab. 6 zeigt die Rf-Werte für Adm, Adm-ol und Adm-on bei zwei- und vierstufiger Chromatographie mit Dichlormethan / Methanol (4 : 1, v : v) auf Riedel-de Häen-Kieselgelalufolien.

	Adm	Adm-ol	Adm-on
zweistufig	0,12	0,06	0,62
vierstufig	0,47	0,28	0,84

Tab. 6 Rf-Werte

Werden beide Fließmittel in einer zweidimensionalen Chromatographie kombiniert, erhält man unscharfe Banden.

2.1.2. Adm, Adm-ol, Adm-on nach der Methode in 5.1 aus Plasma (Adm-on bei pH 2, Adm + Adm-ol bei pH 8,8) extrahiert und zweistufig mit Dichlormethan / Methanol (4 : 1, v : v) chromatographiert ergibt folgendes Chromatogramm (siehe Abb. 4).

2.1.3. Wird Plasma ohne Zusatz von Adm, Adm-ol und Adm-on nach der Extraktion bei pH 8,8 mit Chloroform / Methanol / Wasser (150 : 60 : 10, v : v : v)

chromatographiert, so entstehen am Ort von Adm, Adm-ol und Adm-on störende Plasmabande.

Fließmittelfront

Startlinie

Abb. 4 Chromatogramm eines Extraktes aus Plasma mit (Adm, Adm-ol, Adm-on wurden nach Entnahme zugefügt) Methode 5.1 auf Kieselgel, Fließmittel Dichlormethan / Methanol (4 : 1, v : v) ,zweistufig. Linke Seite: (Extrakt bei pH 8,8 mit 20 ml Chloroform + 5 ml Methanol) 0,5 cm nach Startlinie Adm-ol, 1,2 cm nach Startlinie Adm, vor beiden Banden von Plasmabestandteilen, 2 cm vor Front u.a. Gallenfarbstoffe. Rechte Seite: (Extrakt bei pH 2 mit 20 ml Chloroform) 1 cm nach der Startlinie Plasmabestandteile, 7 cm

n. Stl. Adm-on. Werden Adm-on, Adm und Adm-ol gemeinsam bei pH 8,8 extrahiert, so stören bei Adm und Adm-ol die Banden, die sich nach der Extraktion bei pH 2,2 befinden. Adm-on befindet sich im Bereich der Gallenfarbstoffe (siehe auch 4. Vergleich verschiedener Methoden).

2.2. Säulenchromatographie
Adriamycin wird mit Methanol / Acetatpuffer 0,2 m (pH 4,6) (4 : 1, v : v) als scharfer Gipfel aus Sephadex eluiert. Es erscheint nach 20 ml, nach weiteren 60 ml ist es vollständig entfernt. Das Verdünnungsverhältnis zum Auftrag beträgt 1 : 15. Zwischen 100 und 150 ml erscheint ein weiterer Gipfel, nach 160 ml erhöht sich die Fluoreszenz erneut und sinkt nicht mehr auf den Leerwert ab. Durch saure Hydrolyse (nach Methode 7 A) entsteht also nicht nur Adm-on, es kann noch ein weiteres Hydrolyseprodukt nachgewiesen werden (siehe Abb. 5).
Auch mit einer Kieselgelsäule ist mit Methanol / Acetatpuffer 0,2 m (pH 4,6) (4 : 1, v : v) eine vollständige und scharfe Extraktion von Adm-on nicht möglich.

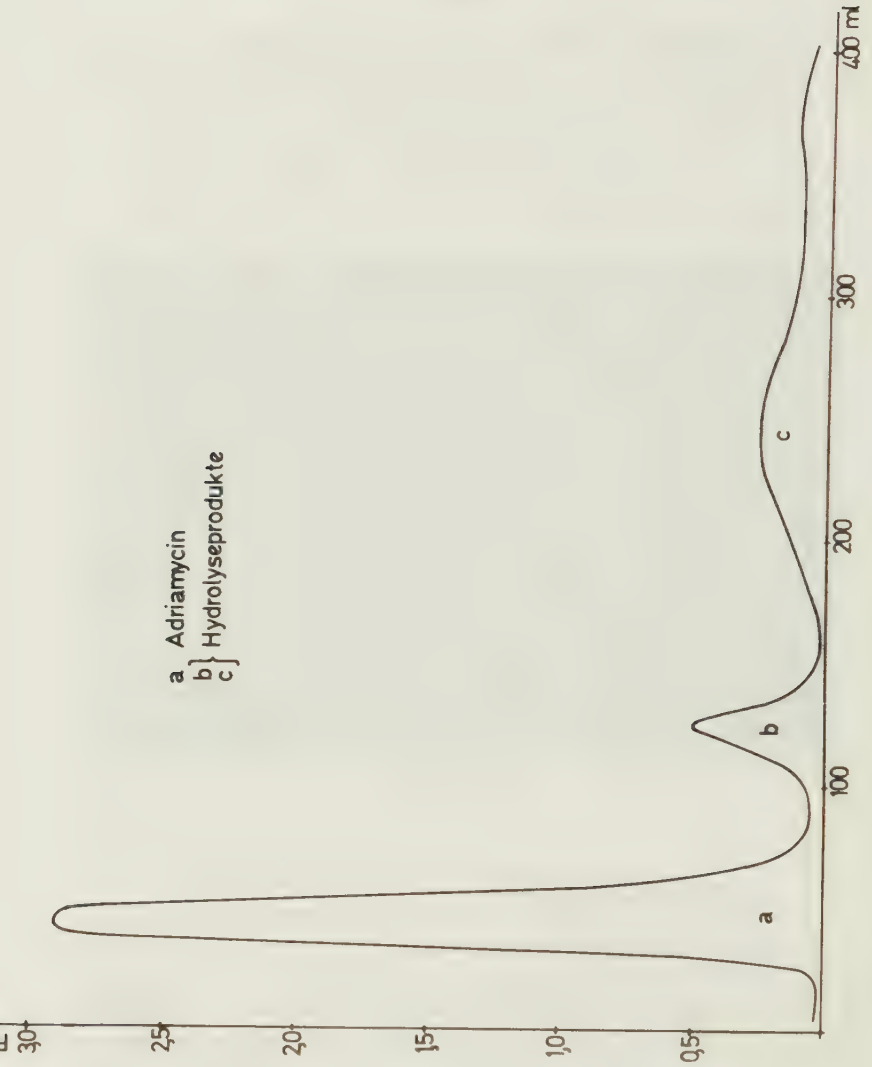


Abb. 5 Trennung von Adm und der Hydrolyseprodukte auf einer Sephadexsäule

3. Spektrographie

3.1. Absorptionsspektrographie

Im Spektrum von 340-620 nm zeigt Adriamycin in Wasser Maxima bei 477 nm, 530 nm, 530 nm und 580 nm. Die Absorption von Adm ist bei 495 nm linear von 5×10^{-7} g/ml bis $1{,}3 \times 10^{-3}$ g/ml. Oberhalb von $1{,}3 \times 10^{-3}$ g/ml wurde nicht mehr gemessen.

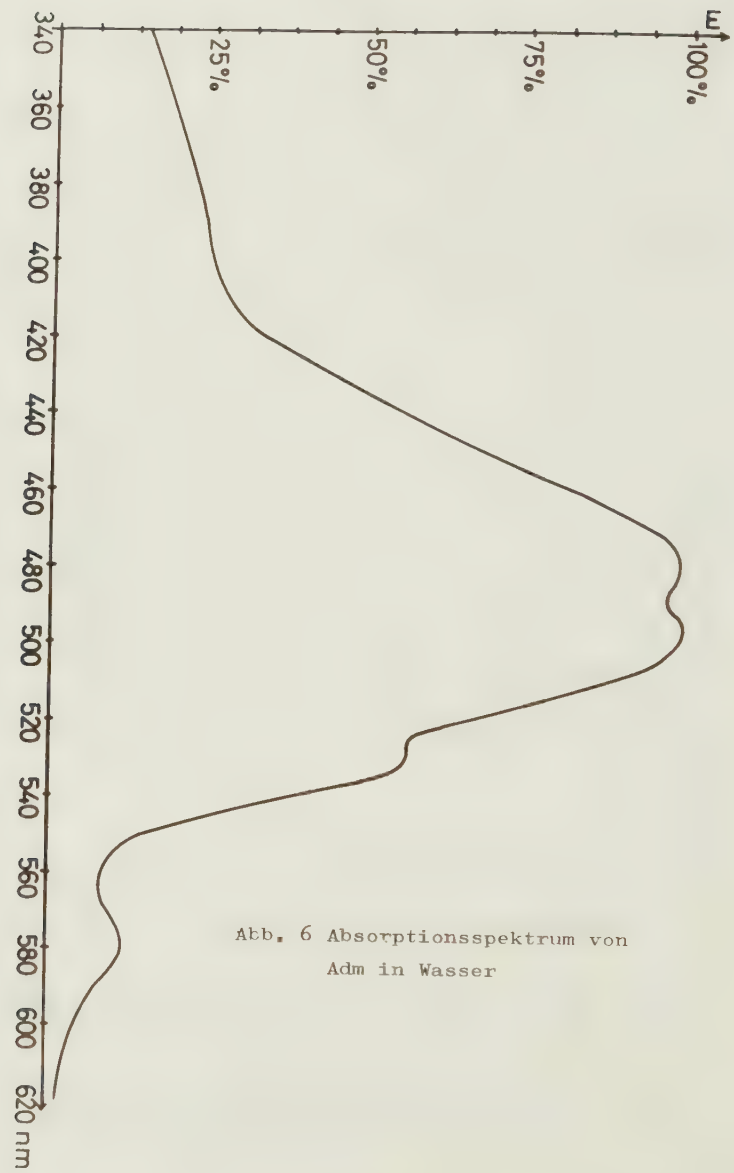


Abb. 6 Absorptionsspektrum von Adm in Wasser

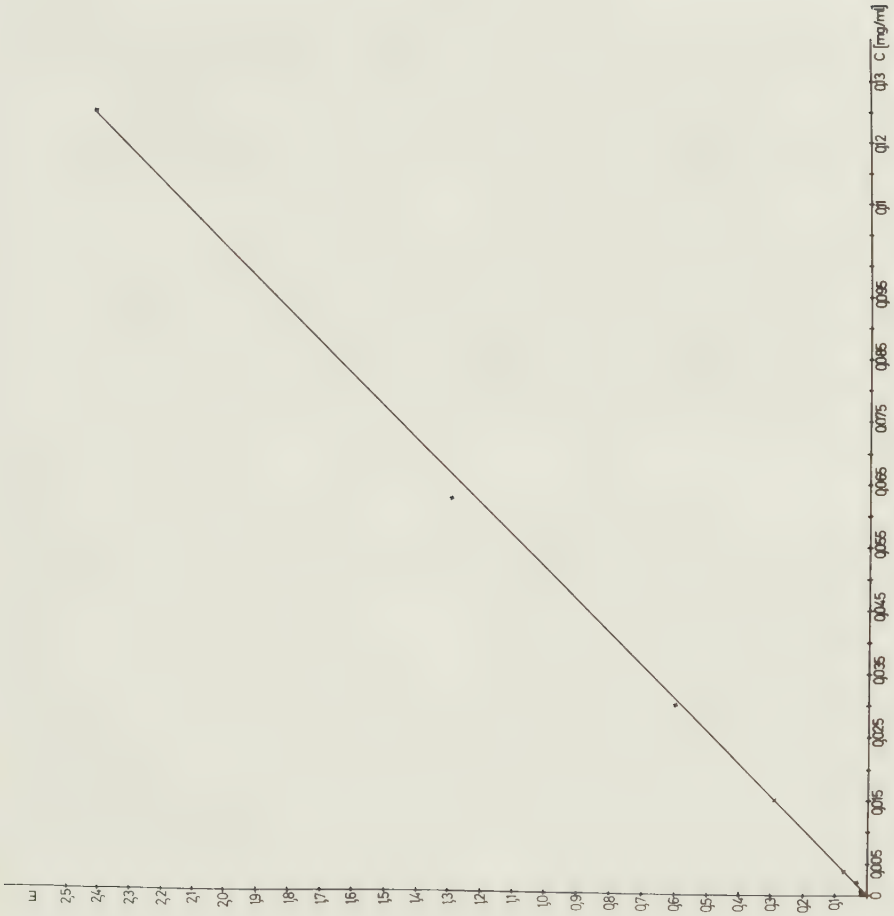


Abb. 7 Eichkurve (Absorption) von Adm in Wasser bei 495 nm

3.2. Fluoreszenzspektrometrie

Die Spektren von Adriamycin, Adm-ol und Adm-on werden bei Einlaß- und Auslaßweite 0,1 mm und Photomultipliereinstellung 0,5 aufgenommen. Das Excitationsspektrum für Adriamycin zeigt Maxima bei 290, 475, 485 und 495 nm. Das Emissionsspektrum hat die Maxima bei 550 und 580 nm (s. Abb. 8).

Adriamycinol hat im Excitationsspektrum Maxima bei 290, 475, 485 und 495 nm, im Emissionsspektrum bei 550 und 580 nm (siehe Abb. 9). Adriamycinon hat im Excitationsspektrum Maxima bei 290, 475, 485 und 495 nm, im Emissionsspektrum bei 550 und 580 nm (siehe Abb. 10).

Abb. 8
Excitations- und
Emissionsspektrum
von Adm.

Abb. 9
Excitations- und
Emissionsspektrum
von Adm-ol.

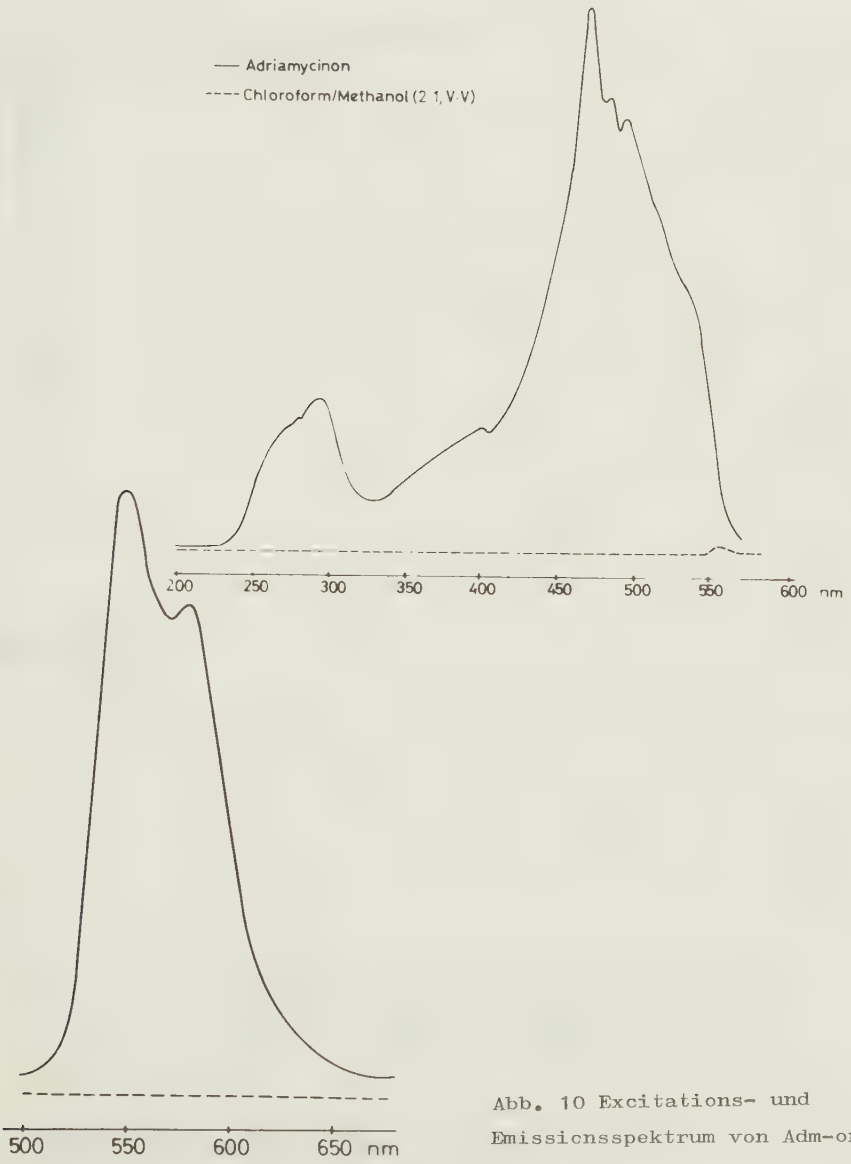


Abb. 10 Excitations- und Emissionsspektrum von Adm-on.

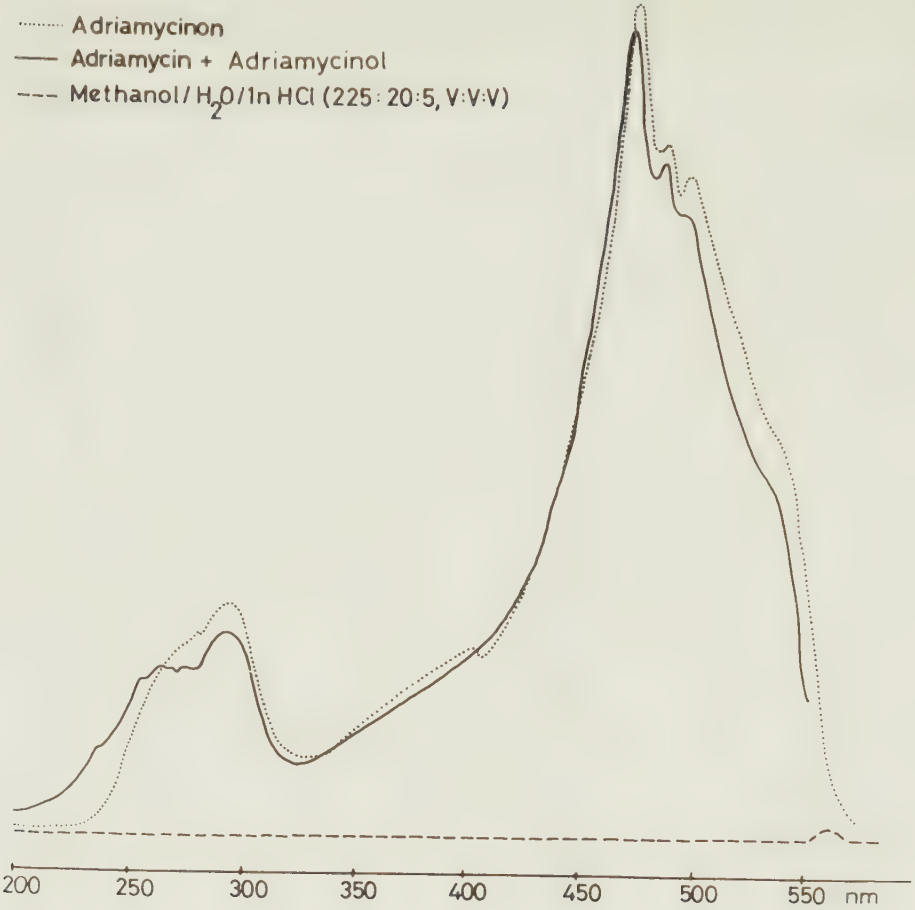


Abb. 11a Vergleich der Excitationsspektren

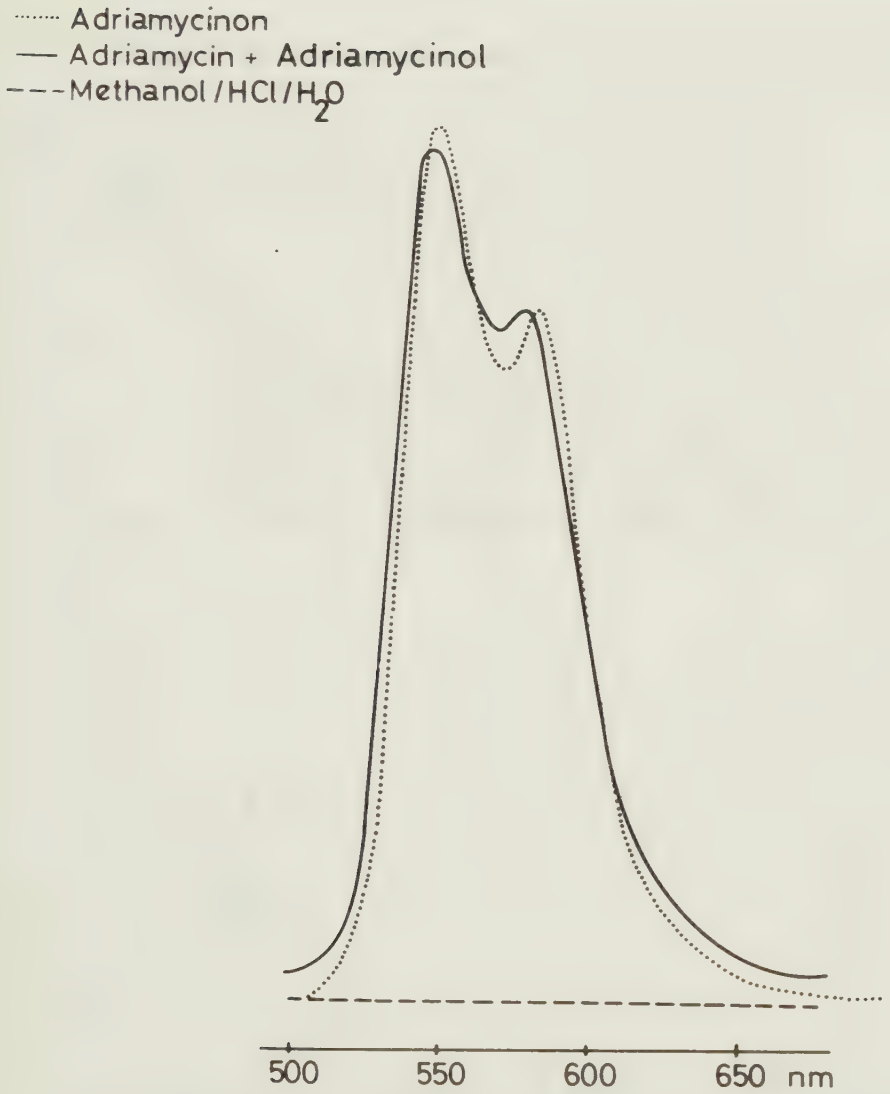


Abb. 11b Vergleich der Emissionsspektren

3.3. Eichkurven

Für Adm und Adm-ol werden die Eichkurven in 1n HCl / H_2O / CH_3OH (5 : 20 : 225, v : v : v) und für Adm-on in $CHCl_3$ / CH_3OH (2 : 1, v : v) erstellt. Gemessen wird bei Ein- und Auslaßspalt 1 mm, PM steht auf 5, Exc 475 / Em 550 nm. Wird vom Meßergebnis (Kreuz) der Leerwert des Lösungsmittels (Adm, Adm-ol: 0,10, Adm-on: 0,076) subtrahiert (Kreis) so entstehen auf doppeltlogarithmischem Papier bei Adm, Adm-ol und Adm-on Geraden. Die Eichkurven von Adm und Adm-ol sind identisch und linear von 10^{-9} - 10^{-5} g/ml. Die Eichkurve von Adm-on hat dieselbe Steigung, ist jedoch nach links verschoben. Der Linearitätsbereich erstreckt sich von 5 x 10^{-10} - 10^{-5} g/ml. Konzentrationen über 10^{-5} g/ml wurden für Adm, Adm-ol und Adm-on nicht gemessen. (siehe Abb. 12-14).

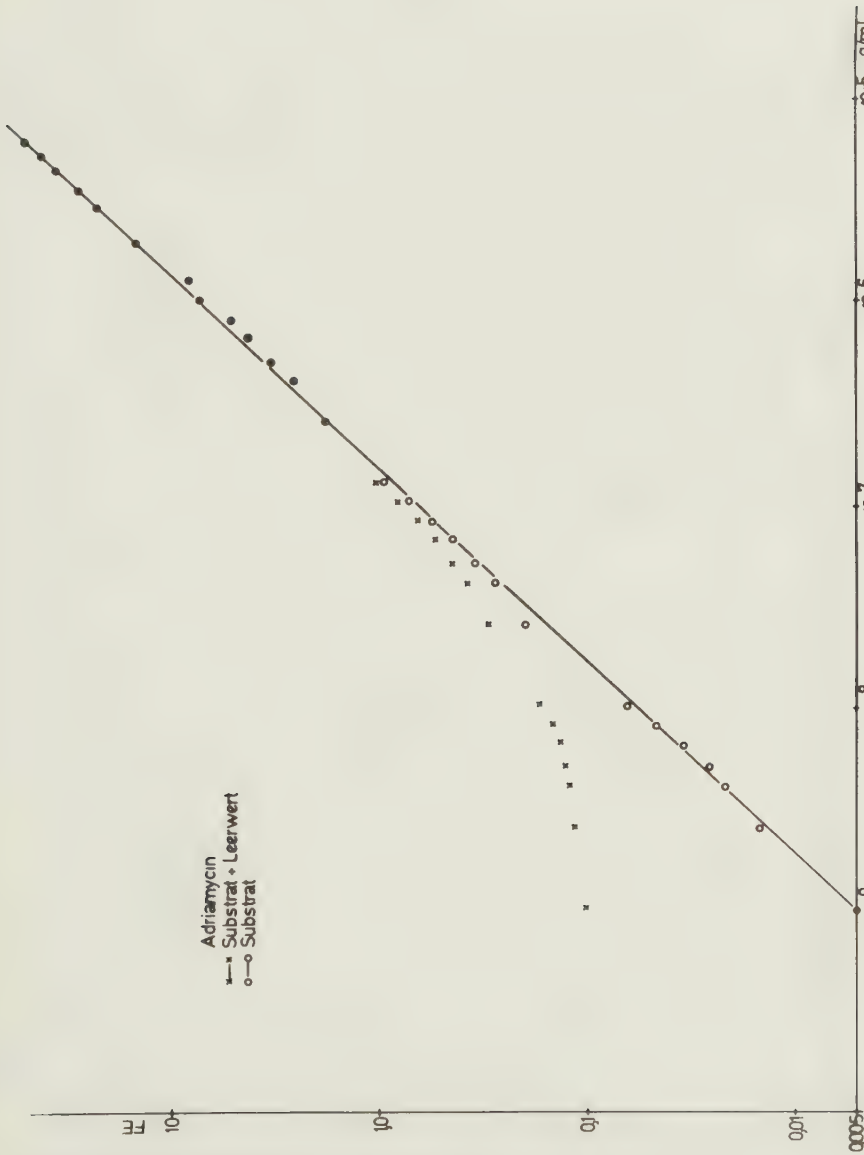


Abb. 12 Eichkurve für Adm

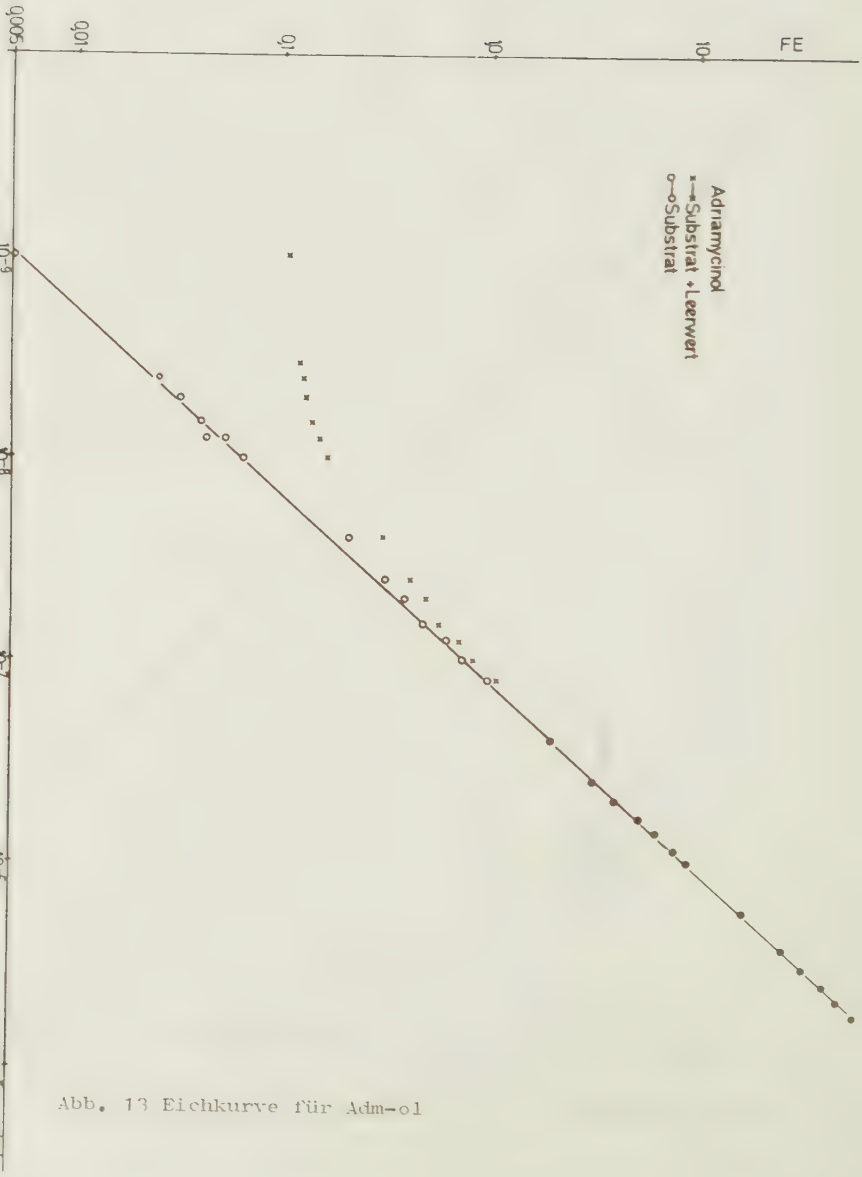


Abb. 13 Eichkurve für Adm-ol

Abb. 14 Eichkurve für Adm-on

4. Vergleich verschiedener Methoden

4.1. Variation des Extraktionsverfahrens
Wird 1 ml Plasma mit 2 ml Tris-Puffer (pH 8,8) auf pH 8,8 eingestellt, 5 ml Methanol hinzugefügt und mit 20 ml Chloroform extrahiert, 4-stufig mit Dichlormethan / Methanol (4 : 1, v : v) chromatographiert und der Leerwert verschiedener Plasmen an der Adm, Adm-ol und Adm-on entsprechenden Stelle gemessen (genaueres zum Verfahren siehe Teil B, 5.1), erhält man die in Tab. 7 angegebenen Werte. Gallenfarbstoffe sind im Chromatogramm in Höhe von Adm-on und stören deshalb. Dadurch variieren die Werte stark und liegen weit über dem Wert des Lösungsmittels. (Tab. 12)

Plasma	Adm(FE)	Adm-ol(FE)	Adm-on(FE)
1	0,172	0,177	0,235
2	0,225	0,172	0,245
3	0,19	0,165	0,24
4	0,19	0,145	0,28
5	0,175	0,130	0,215

Tab. 7 Leerwerte aus verschiedenen Plasmen am Chromatogrammort von Adm, Adm-on und Adm-ol.

Säuert man zuerst mit 0,20 ml 1n HCl auf einen pH 2 an und extrahiert damit zuerst Adm-on ohne Gallenfarbstoff mit 20 ml Chloroform und puffert erst anschließend mit 0,20 ml 1n NaOH und Tris-Puffer auf pH 8,8 und extrahiert dann mit 5 ml Methanol und 20 ml Chloroform (siehe Teil B, 5.1) so erhält man im 4-stufigen Chromatogramm mit obigem Fließmittel die Leerwerte in Tab. 8.

Plasma	Adm(FE)	Adm-ol(FE)	Adm-on(FE)
1	0,11	0,12	0,115
2	0,14	0,11	0,12
3	0,13	0,11	-
4	0,145	0,11	0,11
5	0,14	0,11	0,11

Tab. 8 Leerwerte aus verschiedenen Plasmen am Chromatogrammort von Adm, Adm-ol und Adm-on.

Mischt man die Leerwerte der Plasmen 1-5 aus Tab.7(Leerwert I) und aus Tab.8(Leerwert II) und schreibt ihre Spektren, so liegt der Meßwert von II vor allem im wichtigen Bereich von Excitation 475 nm und Emission 550 nm deutlich unter dem von I (siehe Abb. 15 - 17).

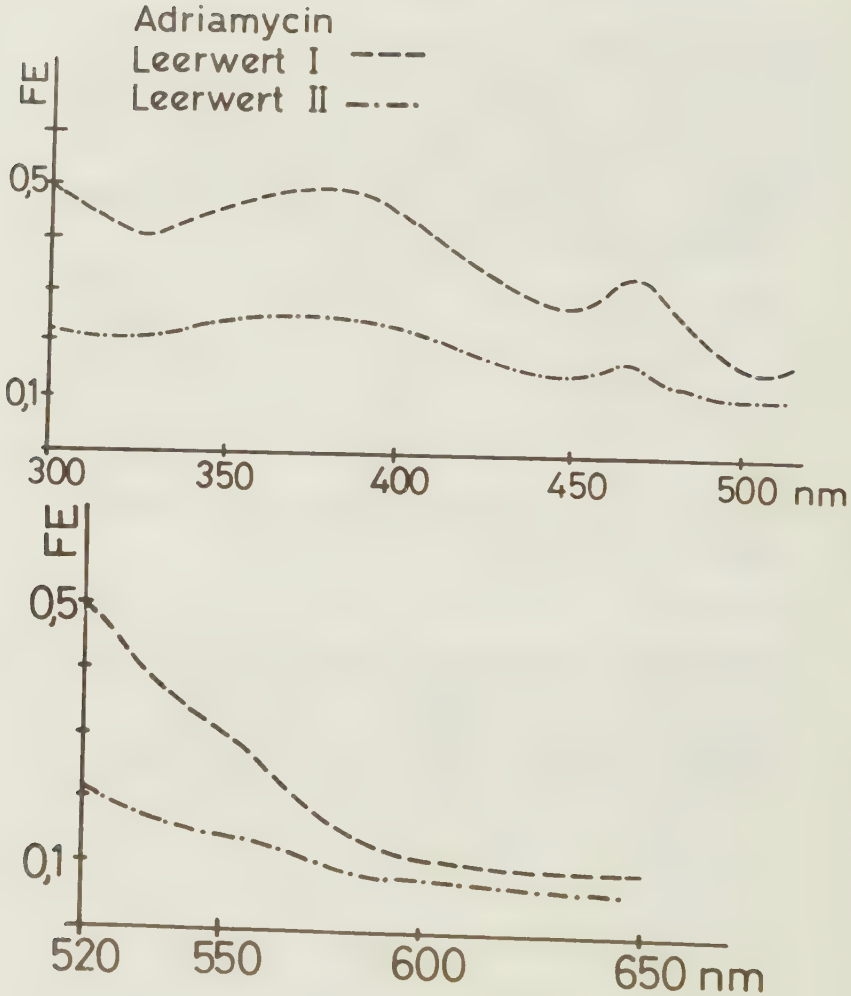


Abb. 15 Vergleich der Leerwerte am Ort von Adriamycin
Vergleich zweier Extraktionsverfahren (I: Extraktion von Adm, Adm-ol und Adm-on bei pH 8,8; II: Extraktion von Adm und Adm-ol bei pH 8,8 nach Extraktion von Adm-on bei pH 2).
Oben: Excitationsspektrum, unten: Emissionsspektrum.

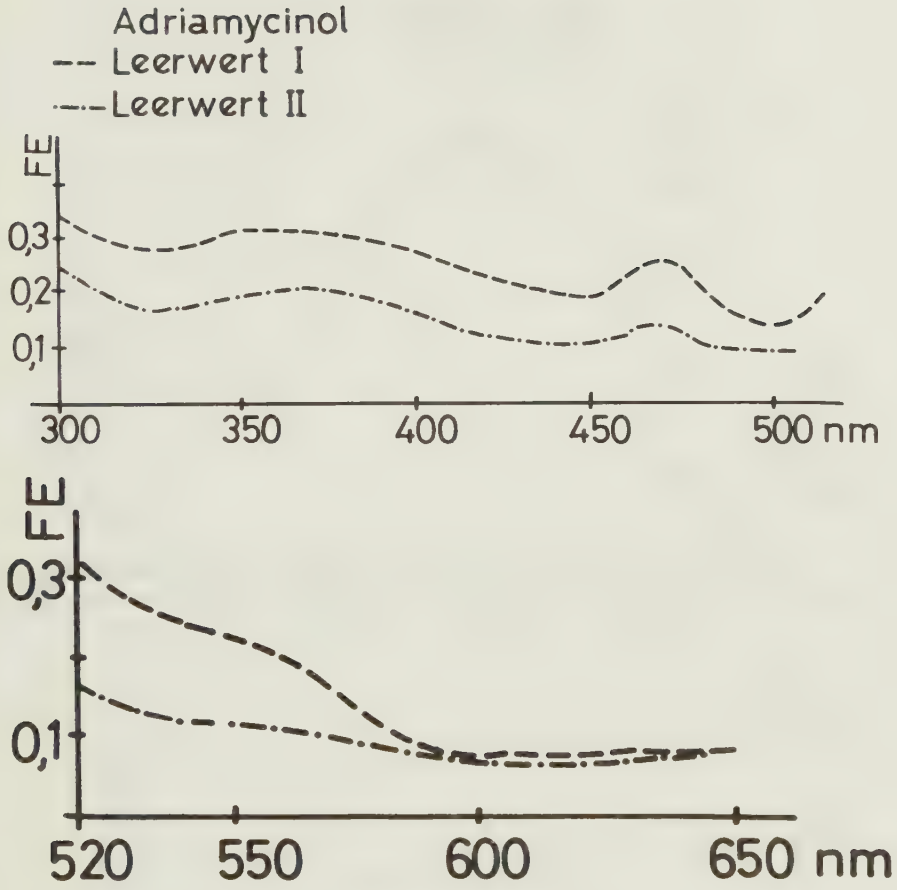


Abb. 16 Vergleich der Leerwerte am Ort von Adriamycinol. Vergleich zweier Extraktionsverfahren (I: Extraktion von Adm, Adm-ol und Adm-on bei pH 8,8; II: Extraktion von Adm und Adm-ol bei pH 8,8 nach Extraktion von Adm-on bei pH 2).
Oben: Excitationsspektrum, unten: Emissionsspektrum.

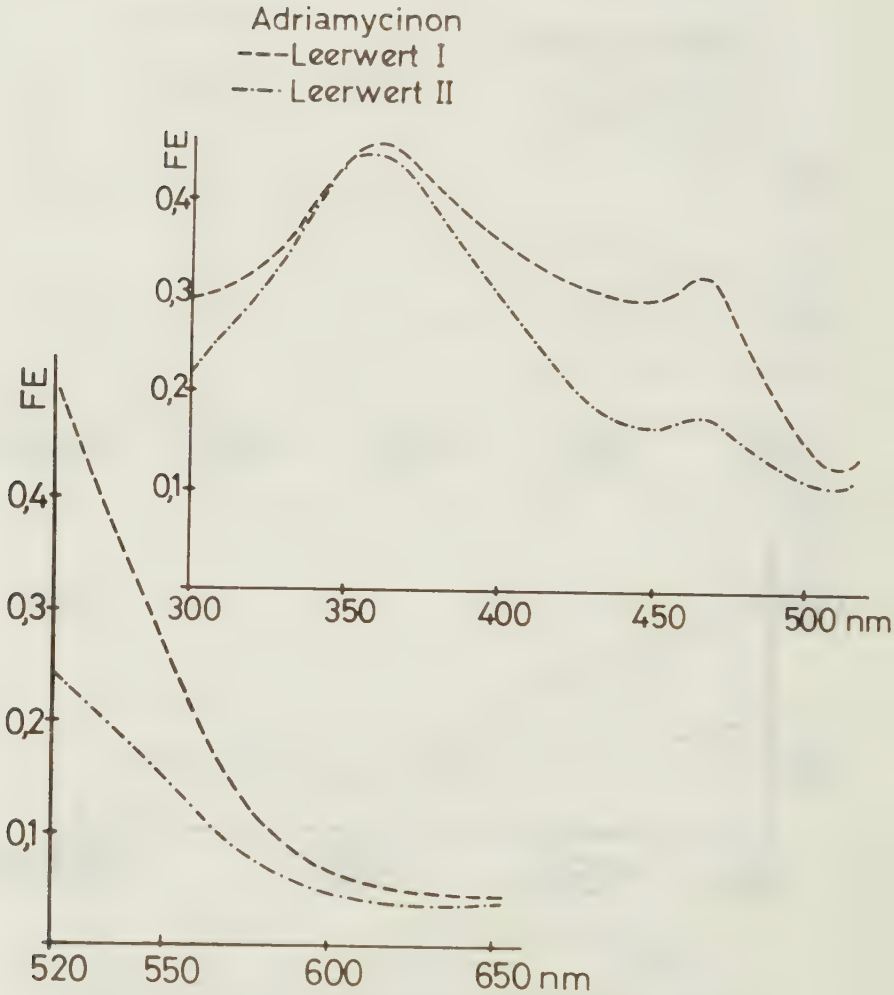


Abb. 17 Vergleich der Leerwerte am Ort von Adriamycinon. Vergleich zweier Extraktionsverfahren (I: Extraktion von Adm, Adm-ol und Adm-on bei pH 8,8; II: Extraktion von Adm und Adm-ol bei pH 8,8 nach Extraktion von Adm-on bei pH 2).
Oben: Excitationsspektrum, unten:Emissionsspektrum.

4.2. Extraktionsgrad für Adm, Adm-ol und Adm-on

Adm, Adm-ol und Adm-on werden in verschiedenen Konzentrationen in verschiedene Plasmen eingebracht und mit Methode 5.1 (Extraktion von Adm-on bei pH 2 mit Chloroform, von Adm und Adm-ol bei pH 8,8 mit Chloroform / Methanol) gewonnen. Der Extraktionsgrad ist dabei von dem Plasma und der Konzentration von Adm, Adm-ol und Adm-on unabhängig.

4.2.1. für Adm

Plasma	1	2	3	4	5	6	7
Konzentration (g/ml)							
$1{,}00 \times 10^{-6}$	52	55,6					
$5{,}75 \times 10^{-7}$			57				
$5{,}00 \times 10^{-7}$				64			
$1{,}00 \times 10^{-7}$		70			60	58	
$5{,}00 \times 10^{-8}$							64,4

Tab. 9 Extraktionsgrad (in %) von Adm bei verschiedenen Plasmen und Konzentrationen. Der Mittelwert der Werte aus Tab. 9 errechnet sich zu 60,25. Die Standardabweichung beträgt 5,56.

4.2.2. für Adm-ol

Plasma	1	2	3	4	5	6	7
Konzentration (g/ml)							
$1{,}00 \times 10^{-6}$	60			67			
$3{,}00 \times 10^{-7}$			73				
$1{,}00 \times 10^{-7}$			68		69		
$5{,}00 \times 10^{-8}$	52	54					
$5{,}00 \times 10^{-8}$	52	48					

Tab. 10 Extraktionsgrad (in %) von Adm-ol bei verschiedenen Plasmen und Konzentrationen. Der Mittelwert aus Tab. 10 errechnet sich zu 59,9. Die Standardabweichung beträgt 9,7.

4.2.3. für Adm-on

Plasma	1	2	3	4	5	6
Konzentration (g/ml)						
$1{,}00 \times 10^{-6}$	50		46			
$5{,}40 \times 10^{-7}$				60		
$4{,}00 \times 10^{-7}$		52				
$1{,}33 \times 10^{-7}$	60	54			44	
$5{,}40 \times 10^{-8}$	40	47				40

Tab.11 Extraktionsgrad von Adm-on (in %) bei verschiedenen Plasmen und Konzentrationen. Der Mittelwert der Werte aus Tab. 11 errechnet sich zu 49,3. Die Standardabweichung beträgt 7,3.

4.3. Vergleich der Spektren des Lösungsmittels, des Platten-, Plasmen- und Plasmen + Adm bzw. Adm-ol oder Adm-on-Extraktes. Die Leerwerte der Plasmen 1-7 aus 4.2.1. werden gemischt. Ebenso werden die Extraktionslösungen der Plasmen 1-7 mit zugefügtem Adm zusammenpipettiert. Aus einer leeren, mit Dichlormethan / Methanol (4 : 1, v : v) chromatographierten Kieselgelalufolie werden am Ort von Adriamycin 4,5 x 0,7 cm große Flächen ausgeschnitten und mit Methanol / 1n HCl / H_2O extrahiert. Die Fluoreszenzspektren dieser drei Lösungen werden mit dem des Extraktionsmittels bei Ein- und Auslaßspalt 1 mm und PM 5 mit x-y Schreiber aufgezeichnet. Man sieht, daß der Leerwert am Ort Adm wesentlich durch Substanzen aus der Platte bedingt ist. Der Abstand des Spektrums von Adm zu dem Leerwert des Plasmas ist im Exc-Spektrum bei 475 nm und im Emissionsspektrum bei 550 nm am größten. Deshalb werden die Proben bei diesen Wellenlängen gemessen (siehe Abb. 18).

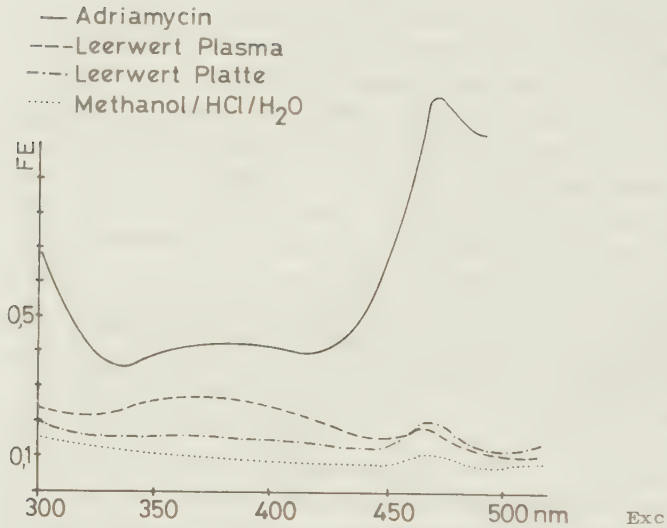
Ebenso wird mit den Lösungen aus 4.2.2. verfahren und die Spektren gemeinsam mit dem Extrakt an der Adm-ol entsprechenden Stelle aus der Kieselgel-Alufolie und dem Extraktionsmittel aufgenommen. Bei Adm-ol liegt der Leerwert der Platte über dem des Plasmas. Die Schwankung des Gerätes ist also größer als die Verunreinigung durch das Plasma. Der Leerwert des Plasmas liegt auch nur mit 0,01 FE über dem des Lösungsmittels. Der Abstand des Spektrums von Adm-ol von dem des Plasmaleerwertes ist im Exc-Spektrum bei 475 nm und im Em -Spektrum bei 550 nm am größten. Die Proben von Adm-ol werden deshalb bei diesen Wellenlängen gemessen (siehe Abb. 19).

Für Adm-on werden mit den Lösungen aus 4.2.3. entsprechende Spektren aufgezeichnet. Auch hier sind die Abstände der Spektren mit Adm-on und dem zugehörigen Plasmaleerwert bei der Exc von 475 nm und der Em von 550 nm am größten (siehe Abb. 20).

Die Meßwerte bei Exc 475 nm und Em 550 nm sind in Tab. 12 zusammengestellt.

	Adm	Adm-ol	Adm-on
Leerwert Platte	0,11	0,11	0,085
Leerwert Plasma	0,13	0,11	0,115
Extraktionsmittel	0,10	0,10	0,076

Tab. 12 Leerwerte



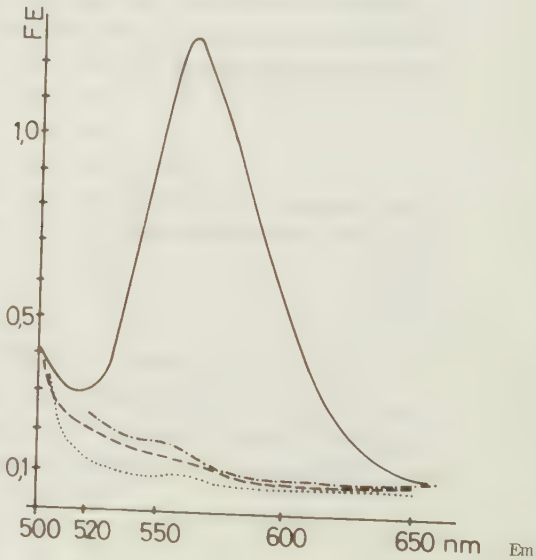


Abb. 18 Spektrum der Extrakte aus Plasma + Adm, Plasma, Platte und Spektrum von Methanol / 1n HCl / H_2O (225 : 5 : 20, v : v : v).

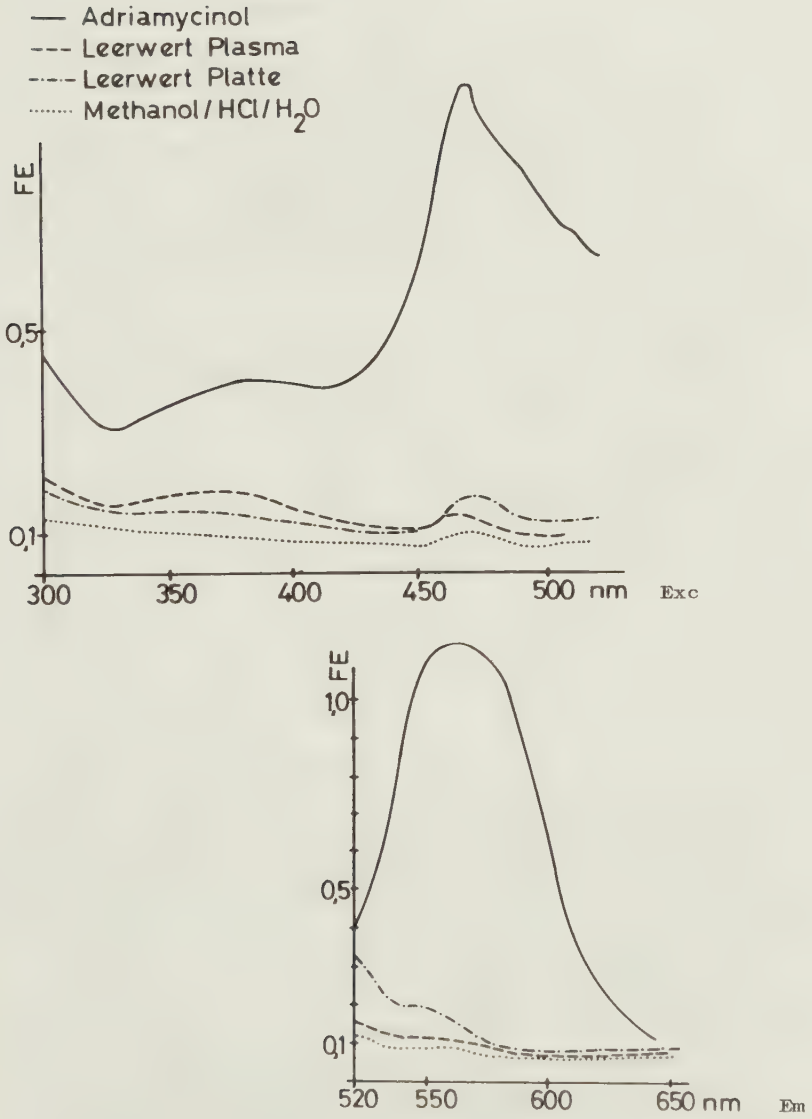


Abb. 19 Spektren der Extrakte aus Plasma + Adm-ol, Plasma, Platte und Spektrum von Methanol / 1 n HCl / H_2O (225 : 5 : 20, v : v : v).

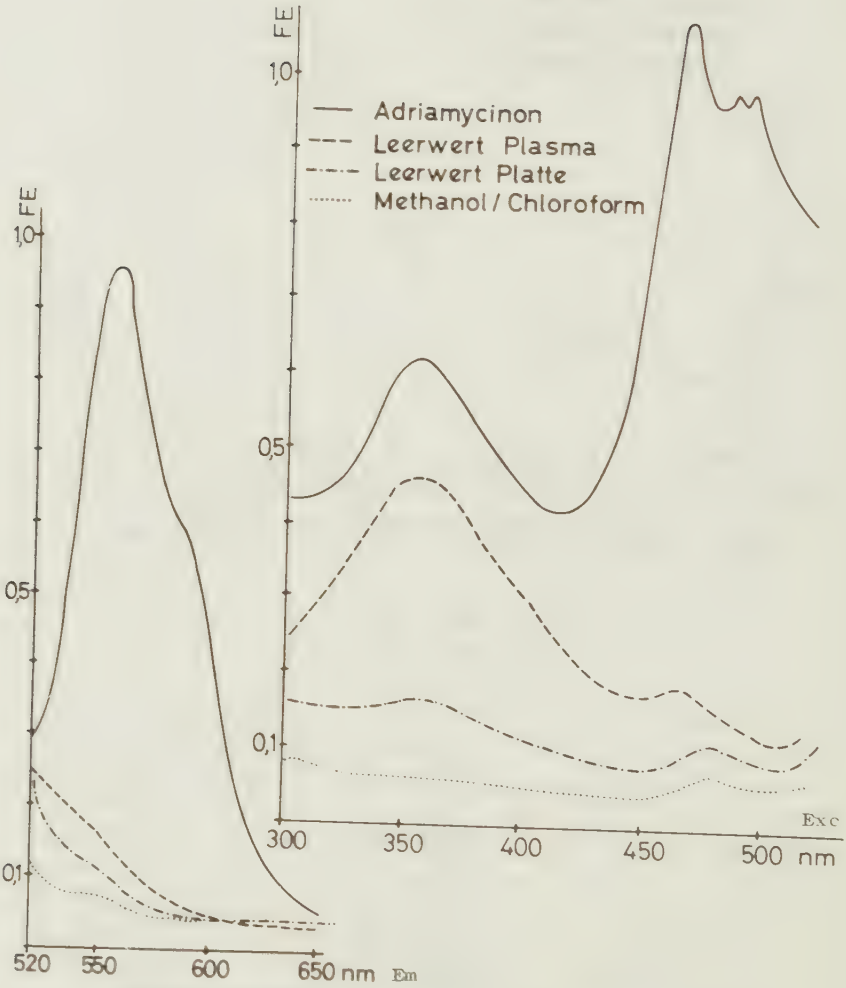


Abb. 20 Spektren der Extrakte aus Plasma + Adm-on, Plasma, Platte und Spektrum von Chloroform / Methanol (2 : 1, v : v).

5. Klinische Anwendung

5.1 Spiegelverlauf in Plasma und Leukozyten
Die Abnahme der Adriamycinkonzentration erfolgt im Plasma (Abb. 21) dreiphasig. Nach einer kurzen Verteilungsphase folgen zwei Phasen mit langer Halbwertszeit. Die Halbwertszeiten für Adm sind: 1. Phase 12,5 Min, 2. Phase 1,5 h, 3 Phase 21 h. Schon nach 5 Min. sind Adm-ol und Adm-on nachzuweisen, die Konzentration von Adm-ol ist 25 %, die von Adm-on 5 % bezogen auf Adm. Nach 2 h erreicht Adm-ol 50 % und Adm-on 35 % von Adm. Die Halbwertzeiten für Adm-ol sind: 1. Phase 12,5 min, 2. Phase 2,0 h, 3. Phase 36 h, für Adm-on betragen sie: 1. Phase 32,5 min, 2. Phase 4 h, 3. Phase 18,8 h. Nach 5 min sind in den Leukozyten schon Adm, Adm-ol und Adm-on nachweisbar. Zwischen 24 und 48 h steigt die Konzentration von Adm und Adm-ol in den Zellen weiter an, Adm-on bleibt annähernd konstant (siehe Abb. 22).

5.2. Metabolismus bei Inkubation mit Vollblut
Werden 5 ml Blut nach Zugabe von 5×10^{-5} mg Adm bei 37° C inkubiert, so sind nach 10 min keine Metaboliten vorhanden.

5.3. Organkonzentrationen
In den Homogenisaten von Leber, Pankreas, Niere und Herz einer 6 Tage nach Adriblastininjektion verstorbenen Patientin (metastasierendes Mamma-Ca, 40 mg/$m^2 \triangleq$56 mg, keine Leberfunktionsstörungen) konnten Adm, Adm-ol, Adm-on und drei weitere Metaboliten nachgewiesen werden. Zwei davon wurden wie Adm-on bei pH 2 extrahiert und liefen im Chromatogramm hinter Adm-on. Ein weiterer Metabolit war zwischen Adm-ol und der Startlinie. Die Konzentrationen konnten jedoch nicht gemessen werden, da die Platten bis zu den Photoaufnahmen mehrere Tage im Licht lagen und dadurch die Intensitäten abnahmen. Beim Abschätzen bei 254 nm überwiegt Adm-on deutlich.

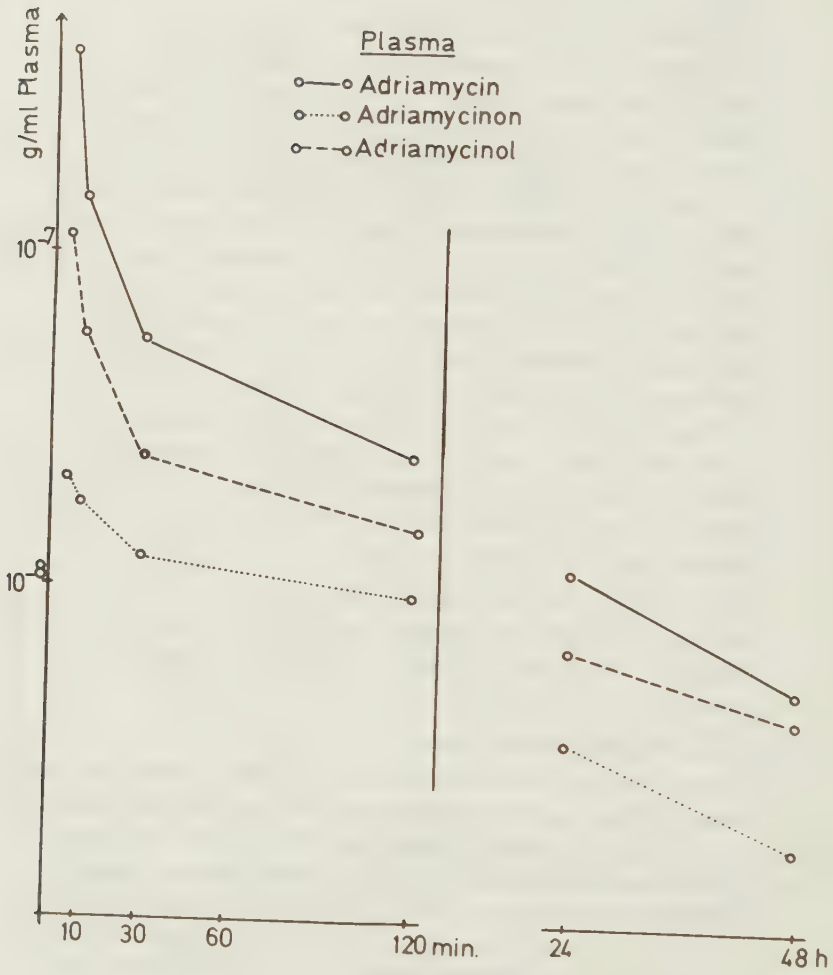


Abb. 21 Plasmaspiegel

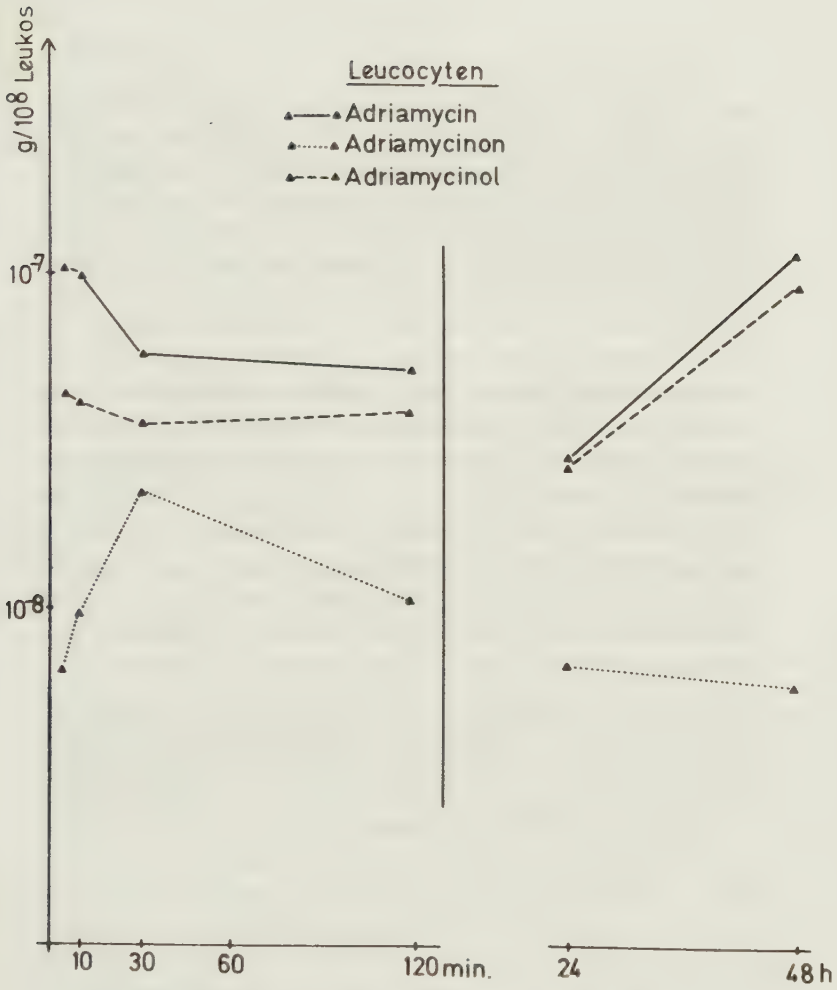


Abb. 22 Leukozytenspiegel

5.4. Haltbarkeit

Bei Plasma von Patienten, die zwischen 20 mg und 60 mg erhielten, und deren Proben ein halbes Jahr bei -20° C in der Kühltruhe gelagert wurden, konnten Adm, Adm-ol und Adm-on nicht mehr nachgewiesen werden. Werden die Platten mit einem Auftrag von Adm, Adm-ol oder Adm-on unter Belichtung gelagert, so nimmt die Rotfärbung der Substanzen ab.

6. Saure Hydrolyse

Bei Methode A (siehe S. 20) werden die Hydrolyseprodukte mit einer Zentrifuge sedimentiert, mit Wasser zweimal gewaschen, getrocknet, und dann mit Chloroform / Methanol / Wasser (150 : 60 : 10, v : v : v) entwickelt. Es lassen sich dabei 3 verschiedene Banden unterscheiden.

Bei Methode B werden die Hydrolyseprodukte filtriert, mit Wasser nachgewaschen, getrocknet und dann wie oben entwickelt. Hierbei lassen sich ebenfalls 3 Banden unterscheiden.

Bei Methode C bleibt das Filtrat aus B 24 h stehen. In dieser Zeit fallen feinflockige Kristalle aus. Diese werden nun nach Methode A behandelt. Im Chromatogramm erkennt man 5 Banden.

D. Diskussion

1. Extraktion

Die unterschiedliche Löslichkeit von Adm und Adm-ol einerseits und Adm-on andererseits läßt sich durch die Änderung der polaren Struktur nach Abspaltung des Aminozuckers erklären. Der apolare Antracyclinring ist nur noch in apolaren Lösungsmitteln löslich. Chloroform ist deshalb als alleiniges Lösungsmittel für alle drei Substanzen ungeeignet. Für Adm und Adm-ol erhöht sich der niedrige Löslichkeitsquotient von Chloroform / Wasser nach Zusatz von Methanol. Das Methanol verteilt sich in beiden Phasen, die Löslichkeit in der organischen Phase nimmt zu, in der wäßrigen ab $(\frac{\text{Chloroform + Methanol}}{\text{Wasser + Methanol}})$. Adm und Adm-ol können nun besser extrahiert werden. Die Abhängigkeit der Extraktion vom pH-Wert hängt wieder mit dem Aminozucker zusammen. Im sauren Bereich lagern sich an die Aminogruppe ein H^+ an. Die Polarität nimmt also zu und damit die Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln ab. Adm und Adm-ol können durch Änderung des Extraktionsmittels noch nicht von Adm-on getrennt isoliert werden, da Adm und Adm-ol in Chloroform schwach löslich sind. Wird jedoch der pH-Wert auf ungefähr pH 2 eingestellt,so sind beide in Chloroform unlöslich und Adm-on kann alleine extrahiert werden. Durch Zugabe von Methanol und Pufferung auf pH 8,8 können Adm und Adm-ol anschließend extrahiert werden. Durch diese Trennung wird die Spezifität und die Reproduzierbarkeit der Methode erhöht. Das Problem, zur Bestimmung des Extraktionsgrades von Adm-on eine wässrige Lösung zu erhalten,wird dadurch gelöst, daß zuerst eine Lösung in Chloroform bekannter Konzentration hergestellt wird. Diese wird dann, um eine grobe Auskristallisierung zu verhindern,in dünner Schicht unter Rotation in einem Glaskolben aufgedampft. Das Adm-on kann nun mit Methanol / Acetatpuffer vollständig gelöst werden.

2. Chromatographie

Die Alufolien (Riedel-de Häen) werden bevorzugt, da durch das Ausschneiden mit einer Schere keine Verluste entstehen. Das Abkratzen der Glasplatten (Merck) ist ungenau und umständlich. Aber auch die Trennung von Adm und Adm-ol ist auf den Riedel-de Häen Alufolien besser. Am Ort von Adm und Adm-ol fanden sich mit Dichlormethan / Methanol im Gegensatz zu Chloroform / Methanol / Wasser keine störenden Banden. Deshalb wird dieses Fließmittel bei der endgültigen Methode verwendet. Könnten in der Galle weitere Metaboliten bestimmt werden, so kann die Trennung durch eine vierstufige Chromatographie weiter erhöht werden. Unscharfe Banden beim Auftrag einer zu großen Substanzmenge können ebenfalls durch eine vierstufige Chromatographie verhindert werden. Auf einer Sephadex- und einer Kieselgelsäule eignet sich Methanol / Acetatpuffer als Eluens für Adm, Adm-on wird jedoch nicht zufriedenstellend eluiert. Adm-ol stand bei diesen Versuchen noch nicht zur Verfügung. Ein apolareres Eluens konnte nicht verwendet werden, da die verwendeten Säulen nur für Wasser und Methanol resistent sind. Inzwischen veröffentlichten Takanashi und Bachur eine Arbeit (44) , in der eine Kieselgelsäulenchromatographie zur Präperation von Urin-Metaboliten verwendet wird. Dabei wird die Säule schrittweise, beginnend mit Chloroform über eine Mischung mit Methanol und zuletzt mit Methanol, eluiert. Diese Methode ist sehr zeitaufwendig und eignet sich deshalb nur zur Reinigung von Metaboliten, um die Struktur nach einer weiteren Dünnschicht-Chromatographie massen- und infrarotspektrometrisch zu bestimmen. Bei der Säulenchromatographie zeigt sich wie bei der Dünnschichtchromatographie, daß es mehrere Hydrolyseprodukte von Adm gibt.

3. Spektrographie und Linearität

Im Absorptionsspektrum von Adm stimmen alle Maxima in Wasser außer dem bei 580 nm mit dem in Methanol überein (3). Als Meßmethode für die klinische Anwendung ist sie jedoch ungeeignet, da Konzentrationen unter 5 x 10^{-7} g/ml nicht gemessen werden können. Adm und Adm-ol haben fluorometrisch diesselben Exc- und Em-Spektren. Die Spektren von Adm-on weichen in der Schulterbreite, als auch in den relativen Höhen der Maxima von ihnen ab. Die Fluoreszenz ist also allein vom Antracyclinringsystem abhängig und wird durch Veränderungen an der Seitenkette nicht, aber durch die Abspaltung des Aminozuckers verändert. Der Linearitätsbereich reicht für Adm und Adm-ol von 10^{-9} -10^{-5} g/ml, für Adm-on von 5 x 10^{-10} -10^{-5} g/ml. Nur bei 4 Arbeiten aus Tab. 2, in der bekannte Bestimmungsmethoden charakterisiert wurden, sind die Linearitätsbereiche angegeben. Benjamin (13) gibt für Adm 3 x 10^{-10} -7,5 x 10^{-6} g/ml, Schwartz (40) für Adm von 2 x 10^{-7} -10^{-5} g/ml und Chan (20) für Adm von 10^{-7} -2,5 x 10^{-6} g/ml (gemessen wird Adm-on) an. Die ersten beiden Methoden bestimmen nur die Gesamtfluoreszenz, die von Chan bedient sich der sauren Hydrolyse von Adm, dabei entstehen, wie in unserer Arbeit gezeigt wird, aber Artefakte. Diese Verfahren sind deshalb für pharmakokinetische Untersuchungen nicht geeignet. Schwartz und Chan tragen ihre Meßwerte doppelt-linear auf, worauf der kleine Linearitätsbereich beruht. Bei Benjamin gibt es darüber kein Schaubild. Watson (50) findet eine Linearität von 10^{-9} - 10^{-7} g/ml für Adm. Da bei der Quantifizierung mit dem DC-Scanner Abweichungen von der Linearität in diesem Bereich auftreten, müssen Standards auf jeder Platte mitgeführt werden. Der in der vorliegenden Arbeit für Adm angegebene Linearitätsbereich entspricht etwa dem von Benjamin, die der anderen Autoren sind kleiner. Für Adm-ol und Adm-on finden sich keine Daten. Bei der Erstellung der Eichkurven ist es wichtig,

daß vom Meßwert der Leerwert des Lösungsmittels subtrahiert wird und dieser Wert wie auch die Konzentration logarithmisch aufgetragen werden.

4. Wahl des Extraktionsverfahrens, Nachweisgrenzen, Spezifität, Reproduzierbarkeit

Werden Adm, Adm-ol und Adm-on gemeinsam bei pH 8,8 extrahiert, so liegen die Leerwerte sehr hoch (siehe C, 4). Wird jedoch zuerst Adm-on bei pH 2 extrahiert, so erniedrigt sich der Leerwert für Adm-on, da die vorher störenden Gallenfarbstoffe im Plasma zurückbleiben. Es werden aber Substanzen mitentfernt, die mit Adm und Adm-ol im Chromatogramm wandern. Für diese erniedrigt sich deshalb auch der Leerwert bei der anschließenden Extraktion bei pH 8,8. Der Leerwert am Ort von Adm entspricht 5×10^{-9} g/ml Adm, am Ort von Adm-ol $2{,}5 \times 10^{-9}$ g/ml Adm-ol und am Ort von Adm-on 10^{-9} g/ml Adm-on. Die Nachweisgrenze wird deshalb für Adm mit 10^{-8} g/ml, für Adm-ol mit 5×10^{-9} g/ml und für Adm-on mit 2×10^{-9} g/ml festgelegt. Diese Angaben beziehen sich auf die Konzentrationen in den Extraktionsmitteln. Die Nachweisgrenze für Adm bei Chan und Harris ist 8×10^{-8} g/ml, bei Watson und Chan 2×10^{-9} g/ml. Die Nachweisgrenze unserer Arbeit könnte durch eine vierstufige Chromatographie weiter gesenkt werden, jedoch reicht sie für eine klinische Spiegelbestimmung weit aus. Die Exc- und Emissionspektren 5 verschiedener Plasmen in C, 4.2 zeigen, daß es keine Substanzen gibt, die die Bestimmung von Adm, Adm-ol und Adm-on stören. Die Methode ist also für Adm und seine Metaboliten spezifisch. Der Extraktionsgrad von Adm, Adm-ol und Adm-on ist unabhängig von Plasma und Konzentration (C, 4.2). Eine eventuelle Änderung der Plasmazusammensetzung während einer Spiegeluntersuchung hat daher keinen Einfluß bei dieser Methode. Auch können die Werte verschiedener Patienten verglichen werden. Die Reproduzier-

barkeit ist mit einer Standardabweichung von 5,56 bei Adm, 9,7 bei Adm-ol und 7,3 bei Adm-on gut. Watson und Chan (50) geben für Adm 3,9, Chan und Harris (20) für Adm 2,9, für Adm-on 10 an. Der Wert von 2,9 ist nicht vergleichbar, da die Werte, aus denen die Standardabweichung berechnet wird, schon Durchschnittswerte aus Doppelbestimmungen sind. Für die Standardabweichung bei der Adm-ol-Bestimmung gibt es keine Vergleichsmöglichkeiten. Von dem zugefügten Adm und Adm-ol konnten 60 %, von Adm-on 50 % wiedergewonnen werden. Watson und Chan erhalten 70 % Adm wieder, hier muß aber berücksichtigt werden, daß die Extraktion von der Platte durch den DC-Scanner wegfällt. Chan und Harris (20) haben mit 92 % für Adm und 88 % für Adm-on die höchste Rate.
Bei der Bestimmung des Leerwertes in Leukozyten entspricht der Leerwert am Ort von Adm 9 x 10^{-9} g/ml, am Ort von Adm-ol 8,5 x 10^{-9} g/ml und am Ort von Adm-on 1,35 x 10^{-9} g/ml. Die Nachweisgrenze in Leukozyten wird deshalb für Adm mit 1,8 x 10^{-8} g/ml, für Adm-ol mit 1,7 x 10^{-8} g/ml und für Adm- on mit 2,7 x 10^{-9} g/ml festgelegt. In der Literatur wurden die Konzentrationen in Leukozyten noch nicht bestimmt. Zur Bestimmung des Extraktionsgrades aus Leukozyten konnten keine Untersuchungen angestellt werden, da keine Leukozyten mit bekannten Konzentrationen hergestellt werden können. Eine Inkubation genügt nicht, da ein Ein- oder Auswärtsgradient möglich ist.
Bei der Spiegelbestimmung wird der Extraktionsgrad aus dem Plasma verwendet. Ein dadurch möglicher Fehler ist nicht bedeutend, da nicht der Absolutwert, sondern die relativen Veränderungen wichtig sind. Die Spiegel in Plasma und Leukozyten sind nicht vergleichbar, da in verschiedenen Bezugssystemen gemessen wird (g/ml bzw. g/10^8 Leukozyten).

Autor	Linearität (g/ml)			Nachweisgrenze (g/ml)			Reproduzierbarkeit		
	Adm	Adm-ol	Adm-on	Adm	Adm-ol	Adm-on	Adm	Adm-ol	Adm-on
vorliegende Arbeit	10^{-9}-10^{-5}	10^{-9}-10^{-5}	$5x10^{-10}$-10^{-5}	10^{-8}	$5x10^{-9}$	$2x10^{-9}$	5,56	9,7	7,3
Chan u. Harris (20)			10^{-7}-$2,5x10^{-6}$	$8x10^{-8}$			2,9 (?)		10
Watson u. Chan (50)	10^{-9}-10^{-7}			$2x10^{-9}$			3,9		
Schwartz (40)	$2x10^{-7}$-10^{-5}								
Benjamin (13)	$3x10^{-7}$-$7,5x10^{-6}$								

Tab. 13 Vergleich mit anderen Verfahren

Bei der Untersuchung des Gewebes einer 6 Tage nach Adriblastin-Injektion (40 mg/m^2) verstorbenen Patientin (met. Mamma-Ca., keine Leberfunktionsstörungen) zeigte sich, daß Adm und Adriamycinon mit dieser Methode in verschiedenen Geweben bestimmt werden können. Die Nachweisgrenze und die Reproduzierbarkeit müssen in weiteren Untersuchungen noch bestimmt werden. Beim Extraktionsgrad bestehen dieselben Schwierigkeiten wie bei den Leukozyten.

5. Klinische Anwendung

Trotz einer geringen Adriblastinmenge von 50 mg (30 mg/m^2) ist die Methode empfindlich genug, um Adm, Adm-ol und Adm-on noch nach 48 h in Plasma und Leukozyten zu bestimmen. Die kurze Halbwertszeit von 12,5 min weist auf einen großen Verteilungsraum hin. Die lange zweite (1,5 h) und dritte Phase (21 h) weisen auf eine langsame Exkretion und einen schwachen Abbau hin. Adm wird rasch in Adm-ol und Adm-on metabolisiert, wobei Adm-ol überwiegt. Dies sind Leistungen außerhalb des Blutkompartimentes, da bei der Inkubation von Adm in Vollblut kein Metabolismus erfolgt. Deshalb erscheint eine intraarterielle Injektion von Adm mit direkter Tumorperfusion sinnvoll. Dies wurde von Haskell et al.(29)versucht, doch wurde die systemische Toxizität dadurch nicht vermindert.
Der Nachweis von Adm-ol und Adm-on als Metaboliten steht im Wiederspruch zu Rosso et al. (38) und di Fronzo et al. (24) die feststellten, daß es keine Metaboliten gibt. Watson und Chan (50)finden nur Adm-ol als Metaboliten. Benjamin et al. berichten über sechs (14), in einer anderen Arbeit (12) über drei Metaboliten (Adm-ol und 2, von Adm-on verschiedene Aglycone) im Plasma, Creasey et al (23) erkennen 2 Metaboliten,

die jedoch nicht genauer identifiziert wurden. Diese verschiedene Anzahl von Metaboliten ist wohl weniger patienten-, als methodenabhängig. Es wäre interessant, dasselbe Plasma mit verschiedenen Methoden zu untersuchen, vielleicht wäre es dadurch besser möglich, die sehr zahlreichen Arbeiten zu vergleichen. Nach früheren Untersuchungen, die die Gesamtfluoreszenz von Adm und seiner Metaboliten maßen, wurde eine Kinetik in zwei Phasen angenommen (13, 16). Nach alleiniger Bestimmung von Adm wurde es jedoch möglich, drei Phasen für Adm zu unterscheiden (12, 50). Die Halbwertszeiten dieser drei Phasen sind etwa: 1. 0,5 h, 2. 8 h, 3. 28 h. Unsere Spiegelbestimmungen zeigen nicht nur für Adm, sondern auch für Adm-ol und Adm-on einen dreiphasen Verlauf. Sie sind für Adm kürzer, dies kann auf individuellen Schwankungen und der geringen Dosierung beruhen.

Der Anstieg von Adm und Adm-ol in Leukozyten zwischen 24 und 48 h ließ sich bei Untersuchungen bei anderen Patienten auch beobachten (noch unveröffentlichte Ergebnisse von H. Stocker). Dies wird durch eine Fixierung im Zellkern verursacht, es ist jedoch auch ein aktiver Einwärtstransport möglich. Diese Aufnahme von Adm in die Zelle und die Konzentration im Kern wurde auch von Egorin et al. (27) und Silvestrini et al. (41) beobachtet. Die hohe Zellaffinität zeigt sich auch daran, daß Adm, Adm-ol, Adm-on und drei weitere Metaboliten bei einer 6 Tage nach Adriblastin-Injektion (metastasierendes Mamma-Ca, keine Leberfunktionsstörungen) verstorbenen Patientin in Leber, Pankreas, Niere und Herz nachgewiesen werden konnten. Adm-on überwiegt dabei. Zwei der neuen Metaboliten sind wahrscheinlich Aglycone, da sie bei pH 2 extrahiert werden und im Chromatogramm hinter Adm-on wandern. Der dritte ist noch polarer als Adm-ol. Da die Chromatogramme zu lange bei Licht gelagert wurden, konnte das Ergebnis nicht quantifiziert werden.

Wichtig für die Genauigkeit der Messungen ist auch, daß das biologische Material wegen der Instabilität von Adm und seinen Metaboliten in wäßrigen Lösungen und an Licht rasch bearbeitet wird.

6 Saure Hydrolyse

Bei den Methoden in Tab. 2 B und bei massenspektrometrischen Strukturbestimmungen (3, 4, 20, 44) wird die saure Hydrolyse verwendet. Da dabei, wie wir zeigen konnten, Artefakte entstehen, sollte dieses Vorgehen nicht mehr angewendet werden.

E. Zusammenfassung

Es wurde eine empfindliche, spezifische und einfache Methode zur Bestimmung von Adriamycin und seinen Metaboliten Adriamycinol und Adriamycinon in Plasma, Leukozyten und Geweben entwickelt. Adm-on wird bei pH 2 mit Chloroform, Adm und Adm-ol bei pH 8,8 mit Chloroform / Methanol (4 : 1, v : v) extrahiert, auf Kieselgel-Alufolie mit Dichlormethan / Methanol (4 : 1, v : v) getrennt und dann fluorometrisch (Exc 475, Em 550 nm) quantifiziert. Der Linearitätsbereich erstreckt sich bei doppeltlogarithmischem Auftrag für Adm und Adm-ol von 10^{-9} bis 10^{-5} g/ml, für Adm-on von 5×10^{-10} bis 10^{-5} g/ml. Die Nachweisgrenze liegt für Adm bei 10 ng, für Adm-ol bei 5 ng und für Adm-on bei 2 ng. Für ein Verfahren mit mehreren Schritten ist die Standardabweichung der Bestimmung von Adm mit 5,56, von Adm-ol mit 9,7 und von Adm-on mit 7,3 relativ gering. Bei Verwendung verschiedener Plasmen treten keine störenden Substanzen auf. Die Empfindlichkeit reicht aus, um bei einem Patienten (ohne Leberfunktionsstörungen) mit einer niedrigen Dosierung von 50 mg $\triangleq$ 30 mg/m^2 Adm, Adm-ol und Adm-on nach 48 h in Plasma und Leukozyten noch nachzuweisen. Zum erstenmal wurde hier der Spiegelverlauf von Adm, Adm-ol und Adm-on in Plasma und Leukozyten gemessen. Neu ist auch der Nachweis von Adm, Adm-ol, Adm-on und drei weiteren Metaboliten in menschlichen Geweben. Sie können in Leber, Pankreas, Niere und Herz einer 6 Tage nach Adriblastin-Injektion (50 mg $\triangleq$ 30 mg/m^2) verstorbenen Patientin (metastasierendes Mamma-Ca, keine Leberfunktionsstörungen) nachgewiesen werden. Ferner wird hier gezeigt, daß bei der sauren Hydrolyse von Adm mehrere Produkte entstehen.

F. Literaturverzeichnis

1. Arcamone, F., Barbieri, W., Franceschi G.,Penco, S.:
Trasformazione della daunomicina in adriamicina.
Chimie Ind., 51, 834 (1969)

2. Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C. and Spalla, C.:
Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from S. peucetius var. caesius.
Biotechnol. Bioeng., 11, 1101-1110 (1969)

3. Arcamone, F., Cassinelli, G., Franceschi, G., Penco, S., Pol, C., Redaelli, S. and Selva, A.:
Structure and physicochemical properties of adriamycin (doxorubicin).
In International Symposium on Adriamycin, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 9-22 (1972)

4. Arcamone, F., Franceschi, G., Penco, S. and Selva, A.:
Adriamycin (14-hydroxydaunomycin),a novel antitumor antibiotic.
Tetrahedron Lett., 13, 1007-1010 (1969)

5. Arena, E., d'Alessandro, N., Dusonchet, L., Gebbia, N., Gerbasi, F., Palazzoadriano, M., Raineri, A., Rausa, L. and Tubaro, E.:
Analysis of the pharmacokinetic characteristics, pharmacological and chemotherapeutic activity of 14-hydroxydaunomycin (adriamycin), a new drug endowed with an antitumor activity.
Arzneimittel Forsch., 21, 1258-1263 (1971)

6. Asbell, M. A., Schwartzbach, E., Bullock, F. J. and Yesair, D. W.:
Daunomycin and adriamycin metabolism via reductive glycosidic cleavage.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 182, 63-69 (1972)

7. Bachur, N. R.:
Adriamycin Pharmacology.
Cancer Chemother. Rep. Part 3, Vol. 6 (2),153-158 (1975)

8. Bachur, N. R., Hildebrand, R. C. and Jaenke, R. S.:
Adriamycin and daunomycin disposition in the rabbit.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 191, 331-340 (1974)

9. Bachur, N. R. and Huffman, D. H.:
Daunorubicin metabolism: estimation of daunorubicin reductase.
Br. J. Pharmacol., 43, 828-833 (1971)

10. Bachur, N. R., Riggs, C. E., Green, M. R., Langone, J. J., Van Vunakis, H. and Levine, L.:
Plasma adriamycin and daunomycin levels by fluorescence and radioimmunoassay.
Clin. Pharmacol. Ther., 21, 70-77 (1976)

11. Benjamin, R. S.:
Pharmacokinetics of adriamycin in patients with sarcomas.
Cancer Chemother. Rep., 58, 271-273 (1974)

12. Benjamin, R.S.:
Clinical pharmacology of adriamycin.
Cancer Chemother. Rep. Part 3, Vol. 6 (2), 183-185 (1975)

13. Benjamin, R. S., Riggs, C. E. and Bachur, N. R.:
Pharmacokinetics and metabolism of adriamycin in man.
Clin. Pharmacol. Ther., 14, 592-600 (1973)

14. Benjamin, R. S., Riggs, C. E., Serpick, A. A. and Bachur, N. R.:
Human metabolism of adriamycin.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. and ASCO, 15, 76 (1974)

15. Benjamin, R. S., Riggs, C. E., Wiernik, P. H. et al.:
Significance of adriamycin metabolism in patients with liver disease (Abstr.).
In Proceedings of the 11 th International Cancer Congress, Florence, Oct 20-26, 4, 751 (1974)

16. Benjamin, R. S., Wiernik, P. H. and Bachur, N. R.:
Adriamycin chemotherapy-efficacy, safety and pharmacologic basis of an intermittent single high dosage schedule.
Cancer, 33, 19-27 (1974)

17. Blum, R. H. and Carter, S. K.:
Adriamycin: A new anticancer drug with significant clinical activity.
Ann. Intern. Med., 80, 249-254 (1974)

18. Bullock, F. J., Bruni, R. J. and Asbell, M. A.:
Identification of new metabolites of daunomycin and adriamycin.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 182, 70-76 (1972)

19. Carter, S. K.:
Adriamycin- a review.
J . Natl. Cancer Inst., 55, 1265-1274 (1975)

20. Chan, K. K. and Harris, Ph. A.:
A fluorometric determination of adriamycin and its metabolites in biological tissues.
Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol., 6, 447-463 (1973)

21. Cortes, E. P., Lutman, G., Wanka, J., Wang, J. J., Pickren, J., Wallace, J. and Holland, J. F.:
Adriamycin cardiotoxicity: a clinicopathologic correlation.
Cancer Chemother. Rep. Part 3, Vol. 6(2), 215-225 (1975)

22. Cradock, J. C., Egorin, M. J. and Bachur, N. R.:
Daunorubicin biliary excretion and metabolism in the rat.
Arch. Intern. Pharmacodyn. Ther., 202, 48-61 (1973)

23. Creasey, W. A., McIntosh, L. S., Brescia, T., Odujinrin, O., Aspnes, G. T., Murray, E. and Marsh, J. C.:
Clinical effects and pharmacokinetics of different dosage schedules of adriamycin.
Cancer Res., 36, 216-221 (1976)

24. Di Fronzo, G., Lenaz, L., Bonadonna, G.:
Distribution and excretion of adriamycin in man.
Biomedicine, 19, 169-171 (1973)

25. Di Marco, A.:
Interactions of oncostatic agents with molecular mechanisms involved in transformation and proliferation.
European Association for Cancer Research, 2 nd meeting, Heidelberg, Oct 2-5, 1973

26. Di Marco, A., Zunino, F., Silvestrini, F. et al.:
Interaction of some daunomycin derivates with deoxyribonucleic acid and their biological activity.
Biochem. Pharmacol., 20, 1323-1328 (1971)

27. Egorin, M. J., Hildebrand, R. C., Cimino, E. F. and Bachur, N. R.:
Cytofluorescence localization of adriamycin and daunorubicin.
Cancer Res., 34, 2243-2245 (1974)

28. Gottlieb, J. A., Baker, L. H., O'Bryan, R. M., Sinkovics, J. G., Hoogstraten, B., Quagliana, J. M. et al.:
Adriamycin used alone and in combination for soft tissue and bony sarcomas.
Cancer Chemother. Rep. Part 3, Vol. 6 (2), 271-282 (1975)

29. Haskell, C. M., Eilber, F. R. and Morton, D. L.:
Adriamycin by arterial infusion.
Cancer Chemother. Rep. Part 3, Vol. 6 (2), 187-189 (1975)

30. Kimura, K., Fujita, H., Sakai, Y.:
Blood levels, tissue distribution and clinical effects of adriamycin.
In International Symposium on Adriamycin, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 124-134 (1972)

31. Kohn, K. W.:
Determination of tetracyclines by extraction of fluorescent complexes.
Anal. Chem., 33, 862-866 (1961)

32. Langone, J. J. and Van Vunakis, H.:
Adriamycin and metabolites: separation by high-pressure liquid chromatography and quantification by radioimmunoassay.
Biochem. Med., 12, 283-289 (1975)

33. Mc Credie, K. B., Bodey, G. A., Guttermann, J. U. et al.:
Sequential adriamycin- Ara-C (A-OAP) for remission induction of adult acute leukemia.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res., 15, 62 (1974)

34. Meriwether, W. D. and Bachur, N. R.:
Inhibition of DNA and RNA metabolism by daunorubicin and adriamycin in L 1210 mouse leukemia.
Cancer Res., 32, 1137-1142 (1972)

35. Minow, R. A., Benjamin, R. S. and Gottlieb, J. A.:
Adriamycin cardiomyopathy- an overview with determination of risk factors.
Cancer Chemother. Rep. Part 3, Vol. 6 (2), 195-201 (1975)

36. Pasqualino, A., Picone, M. A. and Traina, A.:
Spectrofluorometric determination of daunomycin in the tissues.
Arzneimittel Forsch., 19, 774-776 (1969)

37. Rinehart, R. R., Lewis, R. P. and Balcerzak, S. P.:
Adriamycin cardiotoxicity in man.
Ann. Intern. Med., 81, 475-478 (1974)

38. Rosso, R., Ravazzoni, C., Esposito, M., Sala, R. and Santi, L.:
Plasma and urinary levels of adriamycin in man.
Europ. J. Cancer, 8, 455-459 (1972)

39. Salmon, S. and Jones, S.:
Chemotherapy of advanced breast cancer with a combination of adriamycin and cyclophosphamide.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res., 15, 90 (1974)

40. Schwartz, H. S.:
A fluorometric assay for daunomycin and adriamycin in animal tissues.
Biochem. Med., 7, 396-404 (1973)

41. Silvestrini, R., Gambarucci, C. and Dasdia, T.:
In vitro biological activity of adriamycin.
Tumori, 56, 137-148 (1970)

42. Silvestrini, R., Lenaz, L., di Fronzo, G. and Sanfilippo, O.:
Correlations between cytotoxicity, biochemical effects, drug levels and therapeutic effectiveness of daunomycin and adriamycin on sarcoma 180 ascites in mice.
Cancer Res., 33, 2954-2958 (1973)

43. Sutow, W. W., Sullivan, P. and Fernach, D.:
Adjuvant chemotherapy in primary treatment of osteogenic sarcoma.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res., 15, 20 (1974)

44. Takanashi, S. and Bachur, N. R.:
Adriamycin metabolism in man, evidence from urinary metabolites.
Drug Metab. Dispos., 4, 79-87 (1976)

45. Tan, Ch., Rosen, G., Ghavimi, F., Haghbin, M., Helson, L., Wollner, N. and Murphy, M. L.:
Adriamycin in pediatric malignancies.
Cancer Chemother. Rep. Part 3, Vol. 6 (2), 259-266 (1975)

46. Vig, B. K.:
Chromosome aberrations induced in human leucocytes by the antileukemic antibiotic adriamycin.
Cancer Res., 31, 32-38 (1971)

47. Van Vunakis, H., Langone, J. J., Riceberg, L. J. and Levine, L.:
Radioimmunoassays for adriamycin and daunomycin.
Cancer Res., 34, 2546-2552 (1974)

48. Wang, J. J., Chervinsky, D. S. and Rosen C. M.:
Comparative biochemical studies of adriamycin and daunomycin in leukemic cells.
Cancer Res., 32, 511-515 (1972)

49. Wang, J. J., Holland, J. F. and Sinks, L. F.:
Phase II study of adriamycin in childhood solid tumors.
Cancer Chemother. Rep. Part 3, Vol. 6 (2), 267-270 (1975)

50. Watson, E. and Chan, K. K.:
Rapid analytic method for adriamycin and metabolites in human plasma by a thin-film fluorescence scanner.
Cancer Treat. Rep., 60, 1611-1618 (1976)

51. Wilmanns, W. und Wilms, K.:
Adriamycin bei der Behandlung akuter Leukämien. Biochemische Grundlagen und klinische Ergebnisse .
In International Symposium on Adriamycin, Springer-verlag Berlin-Heidelberg-New York, 59-70 (1975)

52. Zunino, F., Gambetta, R., di Marco, A. and Zaccara, A.:
Interaction of daunomycin and its derivates with DNA.
Biochem. Biophys. Acta, 227, 489-498 (1972)

Bei Herrn Herrn Prof.Dr. K. Wilms bedanke ich mich für die Anregung zu dieser Arbeit, seine freundliche Beratung und unermüdliche Unterstützung.
Der medizinisch-technischen Assistentin Frl. B. Proksch danke ich für manche bereitwillige Hilfe und für die Ausdauer und den Einsatz beim Zeichnen der Abbildungen.
Dank auch Herrn Dipl.-Chem. B. Steiner für manchen Rat und Herrn Dr. H. Ehninger für praktische Hilfen.

LEBENSLAUF

Am 11.6.1952 wurde ich, Gerhard Ehninger, als Sohn des Emil Ehninger, Rektor, und seiner Ehefrau Lina, geb. Hamann, in Simmozheim geboren. Nach vierjährigem Besuch der Grundschule wechselte ich 1963 in das Hermann-Hesse-Gymnasium Calw über. Die Schulausbildung schloß ich am 22.6. 1971 mit Abitur ab. Im Wintersemester begann ich in Tübingen das Studium der Medizin. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich im September 1972, die ärztliche Vorprüfung im März 1974, den ersten Teil der ärztlichen Prüfung im April 1975, den zweiten Teil im April 1977 und den dritten Teil am 26. April 1978 ab.

city schnelldruck, marcusstraße 10, 8700 würzburg